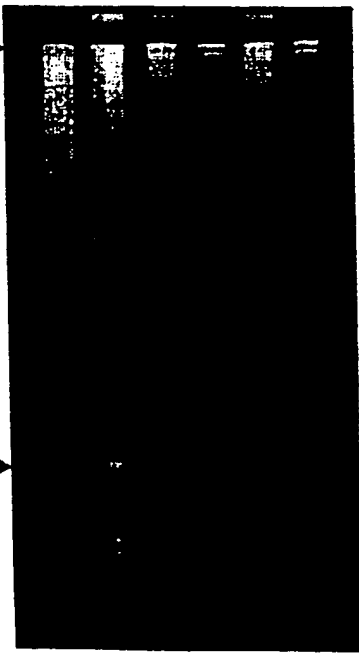


PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/00, G01N 33/68, 33/577 A01N 65/00, A01H 1/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/04025 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. April 1990 (19.04.90)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT89/00058 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. Juni 1989 (13.06.89) (30) Prioritätsdaten: A 2554/88 14. Oktober 1988 (14.10.88) AT (71) Anmelder: BIOMAY BIOTECHNIK PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Herrenstraße 2, A-4020 Linz (AT). (72) Erfinder: BREITENBACH, Michael ; Helfertgasse 44, A- 1120 Wien (AT). KRAFT, Dietrich ; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). RUMPOLD, Helmut ; Buchleitengasse 8/3, A-1180 Wien (AT). SCHEINER, Otto ; Hohe Wandstraße 40, A-2364 Mariaenzersdorf (AT). BREITEN- NEDER, Heimo ; Döblinger Hauptstraße 9/1/7, A-1190 Wien (AT). PETTENBURGER, Karin ; Schwindgasse 3, A-1040 Wien (AT). VALENTA, Rudolf ; Beethovenstraße 18,		A-2604 Theresienfeld (AT). (74) Anwälte: ITZE, Peter usw. ; Amerlingstraße 8, A-1061 Wien (AT).  (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK, FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent).  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(54) Title: PROCESS FOR SCREENING AN EXPRESSION cDNA CLONE BANK FOR POLYNUCLEOTIDES (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SCREENEN EINER EXPRESSIONS-cDNA-KLONBANK ZUR AUFFINDUNG VON POLYNUKLEOTIDEN (57) Abstract <p>A process is disclosed for screening vegetable expression cDNA clone banks by means of IgE antibodies from the serum of allergic patients. This kind of screening is useful for finding polynucleotides whose the open reading frame codes for allergenic proteins. These proteins are characterized by the fact that their allergenic biological activity matches that of natural vegetable allergens.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, bei welchem mittels IgE-Antikörper, die aus Allergikerseren stammen, pflanzliche Expressions-cDNA-Klonbanken gescreent werden. Diese Art des Screenings dient zur Auffindung von Polynukleotiden, deren offener Leserahmen für allergenwirksame Proteine kodiert. Diese Proteine sind dadurch gekennzeichnet, daß ihre biologische Aktivität als Allergen den in der Natur vorkommenden Pflanzenallergenen entspricht.</p>			
<div style="display: flex; align-items: center;"><div style="margin-right: 10px;">23S ▶</div><div style="margin-right: 10px;">5S ▶</div><div style="margin-left: 10px;">M 1 2 3 4 5</div></div>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CG	Kongo	LJ	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Verfahren zum Screenen einer Expressions-cDNA-Klonbank zur  
Auffindung von Polynukleotiden

Einleitung:

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Screenen einer Expressions-cDNA-Klonbank zur Auffindung von Polynukleotiden, die in ihrem offenen Leserahmen für Proteine kodieren, deren biologische Aktivität als Allergene den in der Natur vorkommenden 5 Pflanzenallergenen entsprechen.

Mindestens 10% der Bevölkerung leiden zu verschiedenen Zeiten des Lebens und in verschiedenem Ausmaß an Pollenallergien. Die Patienten klagen zur Zeit des Pollenfluges über Juckreiz in der Nase, 10 juckende und gerötete Augen, Schnupfen, Lidödeme, öfters auch Husten und Asthmabeschwerden. Vorwiegend leichte, durch Wind übertragene Pollen dringen zu den Schleimhäuten der Augen und des Respirationstraktes der Menschen vor, werden lokal teilweise aufgelöst und führen bei Patienten mit genetischer Disposition, 15 sogenannten Atopikern, zur Sensibilisierung und damit zu erhöhter Produktion von IgE-Antikörpern gerichtet gegen verschiedene Proteine aus den Pollen. Es handelt sich dabei in den Monaten Februar bis April um die Pollen von Bäumen, wie z. B. Erle, Hasel, Birke, in den Monaten Mai, Juni und Juli, um die Pollen von Grä- 20 sern und Getreiden sowie in den Monaten Juli und August um die Pollen von Unkräutern, wie Beifuß, Wegerich, Ampfer und Gänsefuß. Bei neuerlichem Kontakt verursachen die Pollenproteine (Allergene) durch Verbindung mit IgE-Molekülen an der Oberfläche von Mastzellen in Schleimhäuten eine Freisetzung von Entzündungs- 25 stoffen, wie Histamin, Leukotrienen, chemotaktischen Faktoren, plättchenaktivierendem Faktor (PAF) u. a., und führen zu einem

typischen Krankheitsbild (Heuschnupfen, Pollenasthma), welches als allergische Reaktion vom Typ I bezeichnet wird.

Die unangenehmen bis gefährlichen Wirkungen einer Pollenallergie werden seit Jahrzehnten mit antiinflammatorischen Medikamenten und/oder mit Hilfe der sogenannten Hyposensibilisierung behandelt. Letztere besteht in der Zufuhr von krankheitsauslösenden Pollenproteinen in langsam steigender Dosierung in Form von Injektionen, oder, bei Kindern, in der Gabe von Tropfen bis zur Erreichung einer deutlichen Abnahme der Symptome (Eintreten einer Toleranz). Diese Form der Immuntherapie gilt auf Grund ihrer Erfolge als Basis jeder Therapie einer Pollenallergie mit ausgeprägter Symptomatik. Voraussetzung für einen guten Erfolg für derartige Behandlungen ist allerdings, daß eine Diagnostik, die Hautteste, serologische Tests u. dgl. umfaßt, mit genau definierten Pollenextrakten vorgenommen werden kann, und daß die Behandlung mit dem die Pollenallergie auslösenden Proteinen in adäquaten, exakt zu bestimmenden Konzentrationen vorgenommen wird. Bisher werden die Pollenproteine dadurch erhalten, daß durch aufwendige Verfahren die Pollen gesammelt werden, wobei zu bedenken ist, daß die gesammelten Pollen in der Regel eine Mischung unterschiedlichster Pflanzenpollen darstellen, die anschließend in aufwendigen Verfahren entmischt, gereinigt und aufgearbeitet werden müssen. Weiters ist es mit den bekannten Verfahren nahezu unmöglich, größere Mengen eines reinen Pollenproteins zu erhalten. Die eine Allergie hervorrufenden Proteine sind nämlich in unterschiedlichsten Konzentrationen an und in den Pollen zugegen, oft abhängig von Klima, Jahreszeit und Wetter. Daher wird bei Verwendung von nicht standardisierten Extrakten in vielen Fällen den individuellen Gegebenheiten der Patienten zu

wenig Rechnung getragen, was sich in mangelhaften Therapieerfolgen widerspiegelt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren der eingangs genannten Art zu schaffen, mit welchem die für allergische Reaktionen einsetzbaren Allergene bzw. die für sie kodierenden Polynukleotide auf einfache und spezifische Weise aufzufinden sind.

10 Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß die in der Expressions-cDNA-Klonbank exprimierten Proteine mittels aus Allergikerseren stammenden IgE-Antikörpern identifiziert werden. Dadurch werden gezielt jene Proteine und die für sie kodierenden Polynukleotide erfaßt, die für die allergischen Reaktionen  
15 verantwortlich sind.

Der cDNA-Klon, der für das im folgenden beschriebene Hauptallergen der Birke, *Bet v I*, codiert, ist in hohem Maße homolog zum dem Krankheitsresistenz der Erbse hervorrufenden Gen (55% Identität, 70% Homologie der Sequenz ohne Lücken). Das Erbsengen ist in  
20 gesundem Gewebe nicht aktiv, wird jedoch bei Kontakt mit Pflanzenpathogenen in großer Menge exprimiert. Es ist daher zu erwarten, daß dieses in hohem Maße konservierte Gen zum Schutz transgener Pflanzen gegen Pflanzenpathogene eingesetzt werden  
25 kann.

M E T H O D I K1) RNA-Isolation wurde durchgeführt aus:

- 1) Blättern
- 2) Infloreszenzen, Wurzeln und Kallusgewebe
- 3) Pollen

von *Betula verrucosa*

5

1) Blatt RNA-Extraktion

5g Blattmaterial, aufbewahrt bei minus 70° C oder frisch gepflückt und in flüssigem N<sub>2</sub> transportiert, wurde in einer mit N<sub>2</sub> gekühlten Mühle zu Staub zermahlen. Dieser wurde in eine Reibschale transferiert und folgende Lösungen wurden hinzugefügt:

- 1) 8 ml Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/Natrium-dodecylsulfat (Tris/SDS) Puffer (0,1 M Tris.HCl pH 8,0, 1% w/v SDS)
- 2) 4 ml mit 1 M Tris.HCl, pH 8,0, gepuffertes Phenol
- 15 3) 4 ml CHCl<sub>3</sub>/Isoamylalkohol (24:1) = CI

Das zerkleinerte Gewebe wurde in dieser Mischung (1-3) zu einer feinen Suspension aufgerührt, in Corex-Röhrchen transferiert, kräftig gemischt und in einer Sorvallzentrifuge 5 Minuten bei 6800 g und 4° C zentrifugiert. Es folgte eine nochmalige PCI(Phenol-CHCl<sub>3</sub>-Isoamylalkohol)-Extraktion der wässrigen Phase, eine Phasentrennung durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 Minuten und nochmalige CHCl<sub>3</sub>-Extraktion der wässrigen Phase. Zu dieser wurden 10 vol% 2M CH<sub>3</sub>COONa (NaAc) pH 5,8 und 250 vol% absolutes Ethanol (EtOH) zugegeben und die gesamten Nukleinsäuren über Nacht bei -25 20° C gefällt.

Diese wurden 10 Minuten in einem Beckmann JS13-1 "swing out"

Rotor bei 3000 g und 4° C abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und in einem Exsiccator getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 2 ml H<sub>2</sub>O aufgelöst und in Eppendorfgeläße transferiert. Darauf folgt die Zugabe von 5 150 mg festem NaCl/ml und Aufbewahrung der Lösung bei 4° C für 5 Stunden.

Die nach dieser Zeit ausgefallene RNA wurde bei 4° C und 15.000 g in einer Eppendorf Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde mit 10 0,5 ml 2,5 M NaCl gewaschen, die RNA wiederum wie oben pelletiert und der Waschvorgang wiederholt. Anschließend wurde das Pellet dreimal mit 0,5 ml 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 360 µl sterilem Wasser gelöst. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 40 µl 2M NaAc, pH 5,8 und 1 ml absolutem EtOH bei -20° C über 15 Nacht. Die RNA wurde wiederum pelletiert, das Pellet zweimal mit 0,5 ml 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 µl sterilem Wasser gelöst. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -20° C.

2) Infloreszenzen, Wurzelmaterial und Kallusgewebe: Cetyltri-  
20 methyllammoniumbromid (CTAB)-Methode

30 g Pflanzenmaterial wurde in flüssigem N<sub>2</sub> zerrieben und mit gleichem Volumen kochenden Extraktionspuffer (2% CTAB, 100 mM Tris.HCl, pH 7,8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% beta-Mercaptoäthanol) übergossen. Die Temperatur der Lösung wurde im Wasserbad 25 unter Rühren auf 50° C gebracht, das Gemisch in SS-34 Zentrifugenröhrchen transferiert und mit gleichem Volumen CHCl<sub>3</sub>:Isoamylalkohol (24:1, CI) versetzt und vorsichtig vermengt. Zentrifugation erfolgte 10 Minuten bei 17.400 g in einer Sorvall SS-34 30 Zentrifuge bei Raumtemperatur. Die wäßrige Phase wurde in ein

zweites Röhrchen transferiert und ein Zehntel Volumen 10% CTAB-Lösung zugegeben (10% CTAB, 0,7 M NaCl). Darauf folgte eine nochmalige CI-Extraktion. Zur abgehobenen wäßrigen Phase wurde ein gleiches Volumen Präzipitationspuffer (1% CTAB, 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0) zugegeben und gut gemischt. Die Lösung wurde 30 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, dann die Nukleinsäuren in einem SS-34 Rotor für 5 Minuten bei 3000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 1 M gepufferter CsCl Lösung (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8,0) gelöst. Es erfolgte eine Zentrifugation über einem Polster aus 5,7 M gepuffertem CsCl 10 (2 ml, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8,0) für 18 bis 20 Stunden bei 120.000 g in einem "swingout" Rotor. Die RNA fand sich im Pellet, wurde in sterilem H<sub>2</sub>O gelöst, gefällt und bei -20° C aufbewahrt.

#### 15 3) RNA-Isolation aus Pollen

500 mg Pollen wurden in einer Reibschale mit feinstzerriebenen Glasstaub unter flüssigem N<sub>2</sub> zermahlen. Es erfolgte eine sofortige Zugabe von: 10 ml PCI, 10 ml Homogenisierungspuffer (10 mM 20 Tris, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0) und 0,5 ml 20 % SDS. Es wurde bis zur Verflüssigung des anfangs noch gefrorenen Gemisches ständig weitergerieben. Dieses Gemisch wurde dann in ein SS-34 Zentrifugationsröhrchen transferiert und auf Eis gestellt. Die Reibschale wurde mit 5 ml Homogenisierungspuffer und 1 % SDS 25 nachgewaschen. Die Lösung wurde in Zentrifugationsröhrchen unter ständiger Zwischenkühlung auf Eis 10 Minuten kräftig gemischt und danach 10 Minuten bei 3.000 g und 4° C zentrifugiert. Es folgte eine zweimalige PCI- und eine einmalige CI-Extraktion der wäßrigen Phase. Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe

von 10 vol% 3 M NaAc, pH 4,8 und 250 vol% absolutem EtOH bei -  
20° C über Nacht. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 12.000 g  
und 4° C wurde das Pellet einmal mit 70% EtOH gewaschen, ohne es  
von der Wand des Zentrifugationsröhrchens abzulösen und in ge-  
5 ringer Menge H<sub>2</sub>O gelöst und auf Eppendorfgefäße verteilt. Eine  
erneute Fällung erfolgt durch Zugabe von 10 vol% 3 M NaAc, pH 4,8  
und 250 vol% absolutem EtOH.

Anreicherung von poly (A)<sup>+</sup>RNA in allen Fällen (1, 2 und 3) er-  
10 folgte nach folgender Methode:

Die RNA wurde für 10 Minuten in einer Eppendorf Zentrifuge bei  
15.000 g und 4°C aus der Fällung abzentrifugiert. Das Pellet  
wurde in einem Exsiccator 10 Minuten getrocknet und anschließend  
in 300 µl sterilem H<sub>2</sub>O auf Eis resuspendiert.

15

Oligo dT-Zellulose wurde in 0,1 M KOH gut suspendiert. Diese  
Suspension wurde in eine 1 ml fassende, mit Quarzwolle verschlos-  
sene Plastiksäule gegossen und diese zu 3/4 gefüllt. Anschließend  
wurde die Säule mit 5 ml 0,1 M KOH gewaschen und mit Wasser bis  
20 zur Erreichung eines neutralen pH-Wertes gespült. Die Säule wurde  
mit 4 ml Ladepuffer (0,5 M LiCl, 10 mM Tris.HCl, pH 7,5, 1 mM  
EDTA, 0,1% SDS) äquilibriert.

Die RNA-Probe wurde mit einer 5 M LiCl-Lösung auf eine 0,5 M  
25 LiCl-Konzentration eingestellt, bei 60°C für 10 Minuten denatu-  
riert und dann auf Trockeneis rasch abgekühlt. Die Probe wurde  
auf die Säule aufgetragen, mit 1 ml Ladepuffer nachgewaschen und  
nochmals auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule  
mit 5 ml "middle rinse" Puffer (10 mM Tris.HCl, pH 7,5, 1 mM  
30 EDTA, 0,15 mM LiCl, 0,1% SDS) gespült.

Die Elution der poly(A)<sup>+</sup> RNA-haltige Fraktion erfolgte durch Spülen der Säule mit 8 x 300 µl Portionen von auf 60°C erwärmtem Elutionspuffer (2 mM EDTA, pH 8,0, 0,1% SDS). Die RNA wurde durch Zugabe von 3 M NaAc, pH 4,8, zu einer Konzentration von 0,3 M und 5 300 vol% absolutem EtOH bei -20°C über Nacht gefällt.

## II) RNA-Charakterisierung

erfolgte durch

10 a) Auftragen der Gesamt-RNA auf ein Polyacrylamid(6%)-Harnstoff(50%)gel und Elektrophorese unter Verwendung von 5S-, 16S- und 23S-RNAs als Vergleichsubstanzen (Fig. 1).

b) Bestimmung der poly(A)<sup>+</sup> RNA-haltigen Fraktion nach oligo-dT-  
15 Säule erfolgte durch Auftragen von Aliquots auf 1% Agaroseplatten mit 0,5 µg Ethidiumbromid/ml und Sichtbarmachung der Dots auf einem UV-Transilluminator.

## III) cDNA-Synthese

20

1 µg poly(A)<sup>+</sup> RNA wurde zur cDNA-Synthese in folgender Reaktion eingesetzt:

a) Synthese des ersten Stranges:

25 4 µl 5 x Puffer für die Synthese des ersten Stranges

(250 mM Tris.HCl, pH 8,3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Dithiothreitol)

1 µl 20 mM Natriumpyrophosphat

1 µl humaner plazentaler RNase-Inhibitor (20 U/µl)

- 2 u1 Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (dATP, dGTP, dTTP: 10 mM;  
dCTP: 5mM)
- 1 u1 oligo dT (12-18) 1,6 mg/ml
- 0,5 u1 alpha  $^{32}\text{P}$ -dCTP (5 uCi)
- 5 H<sub>2</sub>O ad 20 u1

Nach Mischen erfolgte die Zugabe von 20 U reverser Transkriptase und danach Inkubation bei 42° C für 60 Minuten. Die Messung der Synthese des ersten Stranges ergab einen typischen Einbau von 10 100.000 cpm/ug RNA.

b) Synthese des zweiten Stranges

- 20 u1 Reaktionsgemisch von a)
- 20 u1 5x Puffer für die Synthese des 2. Stranges (100 mM Tris.HCl, pH 7,5, 0,5 M KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM Dithiothreit)
- 15 5 u1 alpha  $^{32}\text{P}$ -dCTP (50 uCi)
- 0,8 U Ribonuclease H aus *E. coli*
- 23 U DNA Polymerase I aus *E. coli*
- H<sub>2</sub>O ad 100 u1

20 Mischen und Inkubieren: 12° C für 60 Minuten, 22° C für 60 Minuten, danach 70° C für 10 Minuten. Es folgte ein Abkühlen des Reaktionsgemisches auf Eis, Zugabe von 2,0 U T4 DNA-Polymerase und Inkubation bei 37° C für 10 Minuten (Hier konnte wie oben ein Aliquot zur Messung des radioaktiven Einbaues in den 2. Strang entnommen werden; es ergab sich ein Einbau von 90% des Einbaues in den ersten Strang).

Im weiteren erfolgte eine 2 malige PCI-Extraktion und eine einmalige CI-Extraktion der doppelsträngigen cDNA. Gefällt wurde mit 30 dem gleichen Volumen 4 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 200 vol% absolutem EtOH für

20 Minuten bei  $-70^{\circ}$  C. Die cDNA wurde für 10 Minuten bei 15.000 g und  $4^{\circ}$  C abzentrifugiert, das Pellet in 100  $\mu$ l sterilem  $H_2O$  gelöst und nochmals - wie oben angegeben - gefällt. Das wiederum abzentrifugierte Pellet wurde mit 500  $\mu$ l 70% EtOH gewaschen, 5 Minuten wie oben zentrifugiert und in 20  $\mu$ l ster.  $H_2O$  gelöst.

#### IV) cDNA Klonierung in lambda gt 11

1) Methylierung der cDNA zum Schutz interner Eco RI-Restriktionsstellen. Reaktionsgemisch:

1  $\mu$ g cDNA in 10  $\mu$ l sterilem  $H_2O$

4  $\mu$ l 5 x Eco RI-Methylase-Puffer (250 mM Tris.HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 25 mM Dithiothreitol)

2  $\mu$ l 100  $\mu$ M S-adenosyl-L-methionin (Stocklösung: 10 mM S-adenosyl-L-methionin in 10 mM  $CH_3COONa$ -Puffer, pH 5,0. Verdünnung  $1:10^{-2}$  in sterilem  $H_2O$  kurz vor Gebrauch).

4  $\mu$ l steriles  $H_2O$

20 U Eco RI Methylase

Inkubation bei  $37^{\circ}$  C für 60 Minuten, Enzymaktivierung bei  $70^{\circ}$  C für 10 Minuten.

2) Ligation der Eco RI-Linker: 5'd(pGGAATTCC), 500  $\mu$ g/ml. Linkerligation:

20  $\mu$ l Methylierungsreaktion von 1)

3  $\mu$ l 10x Ligationspuffer (500 mM Tris.HCl, pH 7,5, 100 mM  $MgCl_2$ , 200 mM Dithiothreitol, 50 mM ATP, 50  $\mu$ g /ml bovines Serumalbumin)

2  $\mu$ l Eco RI-Linker (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)

5  $\mu$ l steriles  $H_2O$

5 U T4 DNA-Ligase

Inkubation bei 15° C 16-20 Stunden. Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase wurden die Eco RI-Linker an beiden Enden der cDNA ligiert.

3) Verdau der Eco RI gelinkerten cDNA mit Eco RI.

Dadurch wurde ein einziges Eco RI "sticky end" an jedem Terminus der  
5 cDNA geschaffen und überschüssige Linkermoleküle entfernt. Reaktion:

30 ul Reaktionsgemisch aus 2)

10 ul 10x Eco RI Puffer

60 ul steriles H<sub>2</sub>O

100 U Eco RI (1M Tris.HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>)

10 Inkubation bei 37° C für 5 Stunden, anschließende Enzyminaktivierung bei 70° C für 10 Minuten.

4) Abtrennen der cDNA von überschüssigen Linkermolekülen

Vor der Insertion der cDNA in lambda gt 11 müssen die überschüs-  
15 sigen Linkermoleküle abgetrennt werden, um nicht mit der Klonierung zu interferieren. Zur Trennung wurden kommerziell erhältliche Säulen verwendet, die mit 6 ml STE Puffer (5,84 g NaCl, 1,21 g Tris, 0,37 g EDTA/l, pH 8,0) gewaschen und äquilibriert wurden. 100 ul mit Eco RI verdaute und gelinkerte cDNA wurden auf  
20 die Säule aufgetragen. Es wurden 200 ul Portionen mit STE Puffer von der Säule eluiert und separat in Eppendorfgläsern aufgefangen. Die Aktivität der einzelnen Proben wurde gezählt (Cerenkov) und die Fraktionen mit dem höchsten Zählergebnis vereinigt. Die Fällung der cDNA dieser Fraktionen erfolgte durch  
25 Zugabe von 10 vol% 3 M NaAc und 250 vol% absolutem EtOH bei -20° C über Nacht. Die gefällte cDNA wurde 30 Minuten in einer Eppendorferzentrifuge bei 15.000 g abzentrifugiert und in sterilem H<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 50 ng/ul gelöst.

5) Insertion der mit Eco RI-Enden versehenen cDNA in lambda gt 11

Die lambda gt 11 DNA war bereits mit Eco RI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Clontech RI-lambda gt11, Cat. No. 6331-1) und somit für die Ligationsreaktion bereit:

5

200 ng cDNA

1 ug lambda gt 11 Arme

1 ug 10x Ligationspuffer (wie unter IV, 2.)

H<sub>2</sub>O ad 10 ul

10 2.5 U T4 DNA Ligase

Die Inkubation erfolgte bei 14° C über Nacht.

6) In vitro-packaging des Ligationsgemisches erfolgte mit Giga-pack Plus (Stratagene, Catalogue No. 200211).

- 15 Rasches Auftauen der beiden Extrakte (Sonic extract = SE, vom induzierten "prehead donor" BHB 2690; Freeze / Thaw extract = FTE, vom induzierten "packaging protein donor" BHB 2688). Der gesamte Ligationsansatz wurde zum aufgetauten FTE gegeben und 15 ul SE dazu pipettiert und mit der Pipette vorsichtig gemischt.
- 20 Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Danach erfolgte die Zugabe von 500 ul Phagenverdünnungspuffer (500 mg NaCl, 200 mg MgSO<sub>4</sub>, 5 ml 1 M Tris. HCl, pH 7,5). Aufbewahrung der Phagensuspension erfolgte bei 4° C.

25 7) Vorbereitung der E. coli Y 1090 Wirtszellen

E. coli Y 1090 (ATCC no. 37196 = E. coli delta lac.U.169proA<sup>+</sup> delta lon araD139 strA hflA150 (chr::Tn10) (pMC9)) wurde auf einer LB-amp Platte (1000 ml bestehend aus 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar-Agar, 100 mg Ampicillin, pH

7,5) ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Einzelkolonien wurden gepickt und in 4 ml LB-amp-Medium unter Zusatz von 0,4 % Maltose über Nacht bei 37° C inkubiert. Die Über-Nacht-Kultur wurde abzentrifugiert und in 1 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. Diese Zellen waren für die Phagenadsorption bereit und konnten bei 4° C aufbewahrt werden.

#### 8) Titration der lambda gt 11 Rekombinanten

Es wurde eine Verdünnungsreihe der Phagensuspension (nach dem 10 Packaging) in 10er Schritten angefertigt. Je 100 µl Y 1090 Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> wurden mit je 10 µl Phagensuspension der entsprechenden Verdünnung vermischt. Die Präadsorption der Phagenpartikel an die Wirtszellen erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Zugabe von:

- 15 a) 2 µl Ampicillin (25 mg/ml)
- b) 10 µl 100 mM IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid, gelöst in sterilem H<sub>2</sub>O)
- c) 10 µl einer 2%igen X-gal-Lösung (20 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid in 1 ml Dimethylformamid) pro  
20 ml
- d) 4 ml 0,6 % Agarose in H<sub>2</sub>O (bei 47° C im Wasserbad gehalten)

Rasches Durchmischen und Gießen der Topagarose erfolgte auf vorgewärmte (37° C) LB-amp-Platten. Die Platten wurden 10 Minuten  
25 bei Raumtemperatur zur Verfestigung der Topagarose stehen gelassen und anschließend bei 43° C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgt die Auszählung der weißen Plaques und damit der rekombinanten lambda gt 11 Phagen.

### V) Expression des rekombinanten Proteins und Immunoscreening

Der lambda gt 11 Vektor erlaubt die kontrollierte Expression des rekombinanten Proteins in Form eines Fusionsproteins mit der beta-Galaktosidase.

#### 1) Ausplattieren der cDNA-Bank

Y 1090 Wirtszellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet, mit Phagen infiziert und auf LB-amp-Platten (Durchmesser 145 mm) so ausplattiert, daß eine Dichte von 20.000 Plaques/Platte erreicht wurde. Die Platten wurden für 3-4 Stunden bei 43° C inkubiert, bis die Plaques in Erscheinung traten.

#### 2) Induktion der Proteinexpression

Die Platten mit den Plaques wurden mit Nitrozellulosefiltern (Durchmesser 132 mm, in 10 mM IPTG getränkt und anschließend getrocknet) überlegt und bei 37° C für 3 Stunden inkubiert (Induktion der Expression). Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen, an denen auch die Fusionsprotein adsorbiert waren, vorsichtig abgezogen.

#### 3) Immunoscreening

##### a) Screening mit Patienten IgE

i) Abwaschen der Agarosenpartikel: die Nitrozellulosefilter wurden mit 50 ml GP (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, 0,5% Tween 20, 0,5% w/v Rinderserumalbumin, 0,05% NaN<sub>3</sub>) überschichtet und für 5 Minuten bei 200 rpm auf einem Rundschüttler geschwenkt. Der Puffer wurde abgeschüttet und der Vorgang wiederholt.

ii) Absättigung der freien Bindungsstellen erfolgte mit 25 ml GP für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken

5 iii) 1. Antikörper

Das ausgewählte Serum eines Allergikers, dessen IgE-Antikörper das Hauptallergen der Birke (Bet v I), ein 17,5 kD Protein, erkennen, wurde 1:10 in GP verdünnt; mit dieser Serumverdünnung wurden die Blots über Nacht bei 4° C unter leichtem Schwenken inkubiert.

iv) Waschen der Blots

3 maliges vorsichtiges Waschen der Blots erfolgte mit je 30 ml GP bei Raumtemperatur, wobei beim letzten Waschvorgang die 15 Blots für mindestens 30 Minuten mit dem Puffer geschwenkt wurden. Anschließend wurde der Puffer abgegossen.

v) Radioaktiver 2. Antikörper

26 ml Lösung pro Rundfilter bestehend aus:

2,6 ml  $^{125}\text{I}$  markiertes anti-human IgE (Pharmacia Int.,  
20 300 000 cpm/ml)

23,4 ml GP (s.o.)

234 µl Gelatine (100 µl/10 ml GP)

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken.

25

vi) Waschen der Blots

Die Blots wurden 3x mit je 30 ml GP gewaschen, wobei beim letzten Waschvorgang die Pufferlösung wieder für 30 Minuten über den Blotsn geschwenkt wurde.

## vii) Trocknen der Blots und Exposition

Nach Trocknung der Blots erfolgte der autoradiographische Nachweis der  $\lambda$  gt 11 Klone mit dem für *Bet v I* kodierenden Insert durch Exposition mit einem Kodak XR Röntgenfilm für  
5 72 Stunden bei  $-70^{\circ}$  C.

## b) Screening mit dem monoklonalen Antikörper BIP 1

i) Waschen der Blots erfolgte mit 50 ml TBS (50 mM Tris.HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20)) für 5 Minuten bei 200 rpm  
10 auf einem Rundschüttler und bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Puffer abgegossen und der Vorgang 1x wiederholt.

ii) Absättigen der freien Bindungsstellen mit je 25 ml TBS/PM (= 3% w/v Trockenmilchpulver in TBS) für mindestens 30 Minuten  
15 bei Raumtemperatur und 200 rpm.

## iii) 1. Antikörper

25 ml unverdünnter BIP 1 Hybridomkulturüberstand pro Nitro-  
20 zellulosefilter: die Inkubation erfolgte bei  $4^{\circ}$  C über Nacht unter leichtem Schwenken.

iv) Das Waschen der Blots erfolgte bei Raumtemperatur 3x mit jeweils 30 ml TBS pur, beim letzten Waschvorgang wurde der  
25 Blots mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt.

## v) 2. Antikörper

Die Blots wurden mit einem anti-Maus-IgG Antikörper vom Kaninchen (Jackson Inc., Md, USA, affinity purified, 1:2000 in  
30 TBS/PM verdünnt) eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem

Schwenken inkubiert.

vi) Waschen der Blots

Es erfolgte ein 3 maliges Waschen mit TBS bei Raumtemperatur,  
5 der letzte Waschvorgang für 30 Minuten unter leichtem Schwenken

vii) 3. Antikörper

26 ml pro Nitrozellulosefilter:

10 26 ml TBS/PM

13  $\mu$ l  $^{125}$ J markiertes anti-Kaninchen-Ig von der Ziege  
(Kirkegaard & Perry Labs., London, GB, 300 000 cpm/ml))

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter leichtem  
Schwenken für 1 Stunde.

15

viii) Waschen und Trocknen der Blots

Es folgte 4-maliges Waschen mit je 30 ml TBS (letzter Wasch-  
vorgang für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 200 rpm auf dem  
20 Rundschüttler). Die Blots wurden getrocknet und für 72 Stunden wie oben beschrieben exponiert.

Die optische Detektion der positiven Klone, deren Fusionsprotein in der Lage ist, humanes IgE (Fig. 2) bzw. den monoklonalen Antikörper BIP 1 zu binden, erfolgte durch die Schwärzung  
25 auf den Röntgenfilmen.

VI) Reklonierung und Analyse der rekombinanten lambda gt 11 Phagen aufDNA-Niveau1) Reklonierung

5 Aufgrund der hohen Plaquedichten mußten 2 Reklonierungsschritte zur Anreicherung der positiven Klone durchgeführt werden. Es wurden Phagenstanzen der positiven Plaques und davon Phagensuspensionen angefertigt. Diese wurden wiederum auf die Konzentration der Phagen titriert. Mit Hilfe des Immunoscreenings wurden  
10 erneut die positiven Klone bestimmt. Es konnte eine Anreicherung bis zu 95 % erzielt werden (Fig. 2).

2) DNA-Analysea) Herstellung eines "liquid lysate"

15 Ein singulärer Plaque wurde in 500 µl 10 mM  $MgSO_4$  für mindestens 2 Stunden bei 4° C ausgelaugt. 100 µl dieses Phageneluates wurden mit 100 µl *E. coli* Y 1090 Zellen in 10 mM  $MgSO_4$  vermischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Adsorption der Phagen an die Wirtszellen stehengelassen. Diese Mischung wurde in 50 ml LB-  
20 Medium transferiert. Die Bakterienzellen wurden bei 32° C bis zu einer OD 600 von 0,5-0,6 anwachsen gelassen. Anschließend wurde die Temperatur der Zellkultur im Wasserbad rasch auf 42° C gebracht und für weitere 20 Minuten im Luftbadschüttler bei 42° C gehalten. Danach wurde die Kultur so lange bei 37° C inkubiert,  
25 bis die Lyse der Bakterienzellen abgeschlossen war. Eventuell noch intakte Bakterienzellen wurden durch die Zugabe von 10 µl  $CHCl_3$  lysiert. Das Lysat wurde 10 Minuten bei 10.000 rpm in einem SS-34 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand, der die Phagenpartikel enthielt, konnte bei 4° C aufbewahrt werden.

30 Zu den 50 ml Phagenlysat wurden 10 µl DNase (5mg/ml) und 25 µl

RNAse (10 mg/ml) zugegeben und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Die Phagen wurden danach 1,5 Stunden bei 30.000 rpm in einem Beckmann SW-27 Rotor pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl 50 mM Tris.HCl, pH 8,0 resuspendiert. Die Phenolextraktion erfolgte 5 durch Zugabe gleichen Volumens gepufferten Phenols. Die Suspension mußte für 20 Minuten kräftig geschüttelt und anschließend für 2 Minuten abzentrifugiert werden. Die Phenolextraktion war zu wiederholen. Zur wäßrigen Phase wurden 200 µl CHCl<sub>3</sub> zugegeben, gut gemischt und kurz zentrifugiert. Dieser Vorgang war ebenfalls 10 zu wiederholen. Durch die Zugabe von 20 µl 3 M NaAc und 600 vol% absolutem EtOH zur wäßrigen Phase wurde die Phagen-DNA bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation wurde das Pellet mit 1 ml 70% EtOH gewaschen, dann getrocknet und in 200 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert.

15

#### b) Restriktionsanalyse

1 µg lambda gt 11 DNA wurde mit Eco RI verdaut. Da das Insert nicht aus dem Vektor geschnitten werden konnte, mußten die beiden der Insertionsstelle nächstliegenden Restriktionserkennungsstellen gewählt werden: KpnI und SacI (siehe lambda gt 11 Restriktionskarte, Fig. 3). Dadurch gelang es, ein 2,8 kb großes DNA-Fragment aus dem Vektor zu schneiden (Fig. 4A, Bahn 1; Fig. 4B), das zusätzlich zum Insert rechts und links je 1.000 bp an ursprünglicher lambda-Sequenz enthielt (Fig. 4B). Ein Doppelverdau mit 25 KpnI/Eco RI bzw. SacI/Eco RI zeigte, daß tatsächlich nur eine der beiden Eco RI Erkennungssequenzen verändert worden war, und zwar die der SacI-Schnittstelle näher liegende. Es wurde auf diese Weise ein 1,75 kbp großes Eco RI - SacI Fragment erhalten (Fig. 4A, Bahn 3, mit Doppelkaro markiert). Zum Subklonieren in das 30 Bluescript Plasmid wurde das 2,8 kb KpnI-SacI Fragment verwendet

(Fig. 4A, Bahn 1, mit Karo markiert).

## VII) Fusionsprotein und Westernblot

5 Zum Nachweis der biologischen Aktivität (IgE-Bindungskapazität) des in lambda gt 11 hergestellten Fusionproteins dienten folgende Methoden:

### 1) Herstellung der lysogenen *E. coli* Y 1089

10 Einzelkolonien von Y 1089 (ATCC no. 37196 = *E. coli* delta lac U169 proA<sup>+</sup> delta lon araD139 strA hflA 150 (chr::Tn10)(pMC9)) wurden in 10 ml LB amp Medium mit 0,4% Maltose inokuliert und über Nacht bei 37° C anwachsen gelassen. 1 ml dieser Übernachtskultur wurde in 50 ml auf 37° C vorgewärmtem LB amp - Maltose-  
15 Medium transferiert und bis zu einer OD 600 von 0,5 hochgezogen. Danach erfolgte eine Zugabe von 1 vol% 1 M MgSO<sub>4</sub> zur Kultur und eine Aufteilung in 100 ul Portionen. Dazu wurden 50 ul einer Phagenverdünnung (1,25 x 10<sup>8</sup> plaque forming units/ml) pipettiert. Die Adsorption der Phagen an die Y 1089 Zellen fand für 20 Mi-  
20 nuten bei Raumtemperatur statt. Die so infizierten *E. coli* Zellen wurden auf LB amp Platten in einer Dichte von ungefähr 5 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 32° C inkubiert. Einzelkolonien wurden gepickt und auf 2 separate LB amp Platten ausgestrichen. Eine Platte wurde bei 32° C und eine  
25 bei 43° C inkubiert. Lysogene Y 1089 Zellen wuchsen bei 32° C, aber nicht bei 43° C.

### 2) Herstellung eines Proteinextraktes aus den lysogenen Zellen

100 ml LB Medium wurden mit einer Einzelkolonie eines rekombinanten lysogenen *E. coli* Y 1089 inokuliert. Man ließ die Kultur

auf eine OD 600 von 0,5 heranwachsen, erhöhte dann die Temperatur rasch auf 42° C. Die Kultur wurde 20 Minuten bei 42° C gehalten. Die Zugabe von IPTG zu einer Konzentration von 10 mM führte zur Expression des Fusionsproteins. Die Kultur wurde 60 Minuten bei 537°C inkubiert, die Zellen anschließend bei Raumtemperatur geerntet. Das Zellpellet wurde in 1/30 des ursprünglichen Kulturvolumens in Phosphatpuffer (50 mM Natriumphosphatbuffer, pH 7,5) resuspendiert und sofort in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Auftauen in einem 37° C Wasserbad führte zu einer kompletten Lyse der induzierten lysogenen Bakterienzellen.

### 3) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Immunoblot

Die biologische Aktivität (IgE-Bindung) des Fusionsproteins wurde mittels Westernblot/Immunoblot erfaßt (Fig. 5A, B). Mittels SDS-15 PAGE (12%iges homogenes Polyacrylamidgel, 5%iges Stackinggel) aufgetrennte Proteine (500 ug Gesamtproteinextrakt aus rekombinanten lysogenen *E. coli* Zellen pro Bahn) wurden im elektrischen Feld bei 150 mA über 4 Stunden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Transferpuffer: 25 mM Tris.HCl, 192 mM Glycin, 20 % 20 Methanol, pH 8,3). Die Nitrozellulose wurde in Streifen geschnitten, und freie Bindungsstellen wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur mit folgendem Puffer abgesättigt: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 0,5% Tween 20, 0,5% BSA, 0,05% NaN<sub>3</sub>.

25 Der Nitrozelluloseträger wurde mit Allergikerserum überschichtet, welches in dem Puffer verdünnt war, der dem zur Absättigung der freien Bindungsstellen verwendeten Puffer entsprach. Zur Bestimmung von allergenspezifischem IgE wurde das Allergikerserum in diesem Puffer 1:4 verdünnt, zur Bestimmung des allergenspezifischen monoklonalen Antikörpers (BIP 1) wurden Gewebekultur-30

Überstände von Hybridomzellen unverdünnt eingesetzt.

Die Nitrozellulosestreifen wurden jeweils mit dem verdünnten Serum bzw. unverdünnten Überstand über Nacht bei 4° C in schaukelnder Bewegung inkubiert. Die so inkubierten Streifen wurden nun 5 dreimal in den für die Absättigung der freien Bindungsstellen verwendeten Puffer gewaschen. Für die Bestimmung des allergenspezifischen IgE wurden die Streifen für 12 Stunden bei Raumtemperatur mit <sup>125</sup>J anti-Human-IgE inkubiert. Dieses anti-IgE wurde im oben angegebenen Puffer 1:4 verdünnt, der zusätzlich 20 mM an 10 Natriumazid war und 0,4 % Gelatine enthielt.

Nachweis des monoklonalen Antikörpers BIP 1: Es folgte der Zusatz der entsprechenden Antiglobulin-Reagenzien (anti-Maus IgG vom Kaninchen) verdünnt im oben angegebenen Probenpuffer 1:3.000. Die 15 Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur, es folgte dreimaliges Waschen im Absättigungspuffer. Anschließend wurden die Nitrozellulosestreifen getrocknet und auf Papier aufgeklebt. Die Menge der gebundenen <sup>125</sup>J-markierten Antikörper wurde dadurch bestimmt, daß die Streifen mit einem Röntgenfilm (Amersham RPN 6) 20 in einer Kodakkassette mit Verstärkerfolie eingelegt wurden. Exposition erfolgte bei -70° C für 76 Stunden. Die Entwicklung wurde mit kommerziell erhältlichen Entwicklern für Röntgenfilme vorgenommen. Die über die radioaktiven Antikörper markierten Proteinbanden wurden durch entsprechende Filmschwärzung sichtbar 25 (Fig. 5A,B).

#### VIII Subklonierung des 2,8 kb Fragments SacI - KpnI

In der weiteren Folge wurden für die elektrophoretische Iso- 30 lierung des Insertionsfragmentes, die den beiden Eco-RI-Schnitt-

stellen zunächstgelegenen Schnittstellen, nämlich SacI und KpnI gewählt. Die Abstände zwischen Insert-(Eco RI-) Ende und den beiden Restriktionsendonukleasen SacI und KpnI betragen auf der KpnI-Seite 1020, auf der SacI-Seite 1060 Basenpaare (siehe 5 Fig. 4).

1) Isolierung eines DNA-Fragmentes aus einem Agarosegel

a) In zwei Durchgängen wurden auf 1%igen Agarosegelen folgende Verdaue aufgetrennt:

10 Je 20 ug recombinante lambda gt11-DNA (plus 2,8 kb Insert)  
in 20 ul H<sub>2</sub>O

20 ul 10 x Puffer ("low salt P.": 10 mM Tris, pH 7,5,  
10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 ug/ml BSA)

60 U KpnI

15 160 ul H<sub>2</sub>O

Gesamtvolumen: 200 ul

Die Mischung wurde 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Für den unmittelbar anschließenden SacI-Verdau wurde die NaCl-Konzentration durch Zugabe von 2 ul 4 M NaCl in H<sub>2</sub>O auf 40 mM eingestellt; dies 20 entspricht annähernd dem für SacI optimalen "Medium Salt Puffer" Mileu. Hierauf wurden 60 U SacI zugegeben und der Verdau weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Größe von 750 bp für das cDNA-Insert ergab sich aus der Differenz der Länge des tatsächlichen Fragmentes von 2830 Basen- 25 paaren mit der Länge des aus der lambda gt11 Restriktions-Karte zu berechnenden KpnI-SacI-Abschnittes von 2080 Basenpaaren. Das erhaltene Fragment wurde nun für die genauere Charakterisierung der klonierten cDNA in ein geeignetes "Multipurpose-Plasmid", 30 nämlich das Bluescript-Plasmid (Fig. 6) zwecks Sequenzierung von

zirkulärer Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA ligiert.

b) Elution des Fragments

Die im UV-Licht aufgrund der Ethidiumbromideinlagerung gut sicht-  
baren DNA-Banden auf der Höhe von 2,8 kb wurden auf DE81 Whatman-  
5 Filter, die durch Schlitze den Gelfragmenten auf der Anodenseite  
vorgeschalten wurden, aufgebracht. Die Filterstücke wurden mit je  
2x 300  $\mu$ l low salt Waschpuffer (0,2 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM  
EDTA, pH 8,0) gewaschen und dann mit 2 x 300  $\mu$ l high salt Eluti-  
10 onspuffer (1 M NaCl, sonst wie Waschpuffer) daraus die DNA elu-  
iert. Nach 2maliger Phenol- und Etherextraktion der wäßrigen  
Phase mit anschließender Ethanolfällung über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$   
wurde die DNA pelletiert (15 000 g, 20 Minuten), mit 70%igem  
Ethanol gewaschen, wieder pelletiert (15 000 g, 10 Minuten) und  
15 im Vakuum getrocknet. Die gesamte Menge der eluierten 2,8 kb  
Fragmente beider Gele wurde in insgesamt 10  $\mu$ l Wasser gelöst und  
vereinigt. Ein Aliquot (0,7  $\mu$ l) wurde zur quantitativen Beurtei-  
lung auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die erhaltene Bande  
von 2,8 kb ließ auf eine Gesamtmenge von 200-300 ng für beide  
20 Fragmente bei einer Konzentration von 20-30  $\mu\text{g/ml}$  schließen.  
Daher wurde die Ligation in Bluescript als Voraussetzung für alle  
weiteren Charakterisierungsschritte durchgeführt.

2) Vorbereitung des Plasmids für die Ligation

25 a) Die Bluescript-Plasmid-Subvarianten M13 SK<sup>+</sup> und M13 SK<sup>-</sup>  
(Fig. 6) wurden mit KpnI und SacI verdaut.

Je 2  $\mu\text{g}/2$   $\mu$ l Plasmid (SK<sup>+</sup> bzw. SK<sup>-</sup>) wurden mit je 30 U KpnI und  
SacI (wie unter VIII 1 a beschrieben) verdaut.

b) Ligation in M13 SK<sup>+</sup> und M13 SK<sup>-</sup>

Die verdaute Plasmid DNA wurde (wie unter VIII 1 b beschrieben) gewaschen, pelletiert, getrocknet und in je 5 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Zur Ligation in das Bluescript-Plasmid wurden

- 5 zu je 4,8 µl eluiertem und gereinigtem 2,8 kb-Fragment
- 5 µl Plasmid (SK<sup>+</sup> bzw. SK<sup>-</sup>)
  - 2 µl dATP (100 mM)
  - 2 µl 10x Ligasepuffer (500 mM Tris, pH 7,4, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Spermidin)
- 10 0,5 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl)
- 6 µl H<sub>2</sub>O

pipettiert und der Ligationsansatz 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

## 15 c) Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Für die Transformation wurde ein für das Bluescript-Plasmid geeigneter *E. coli*-Stamm, XLI-Blue (recAI, endAI, gyrA96, thi, hsdR17 (rk<sup>-</sup>mk<sup>+</sup>) supE44, relAI, lambda-, lac-, (F'proAB, lac IqZ delM15, TN10)), gewählt, der eine Selektion Insert-tragender Bluescript-Plasmide durch das beta-Galaktosidase-blau-weiß-Farb-indikatorsystem ermöglicht (siehe IV 8).

*E. coli* XLI Blue wurde mit 100 mM CaCl<sub>2</sub> bei 0°C "kompetent" gemacht: 50 ml einer exponentiellen Kultur (XLI Blue in LB-tet (Tetracyclin: 20 mg/l)) wurden bei einer OD von 460 bei 600 nm 25 pelletiert. Das *E. coli*-Pellet wurde zuerst in 50 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> suspendiert, nach einer weiteren Inkubation (20 Minuten bei 0°C) abzentrifugiert und in 5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach 4 Stunden bei 0°C wurde die Transformation durchgeführt:

30 Je 1/5 der beiden unter VIII 2 b beschriebenen Ligaseansätze

wurde mit 100 µl kompetenter XLI-Blue-Zellen, die anderen 4/5 mit 200 µl kompetenter Zellen bei 0°C eine Stunde inkubiert. Durch einen anschließenden zweiminütigen Hitzeschock der *E. coli*-Bakterien bei 42°C kommt es zu einer Aufnahme der Plasmid-DNA durch die Bakterienwand.

Nach Ausplattieren der Transformationsgemische auf LB-tet-Platten und 18-24 stündiger Inkubation bei 37°C wurden eine Serie weißer Kolonien aus SK<sup>+</sup> und SK<sup>-</sup> Transformanten in Vorkultur gebracht. In einer Plasmid-"Mini"-Präparation nach Methode der alkalischen Lyse wurde aus diesen Vorkulturen die Plasmid-DNA isoliert und anschließend durch KpnI/SacI Kontrollverdau das Vorhandensein des 2,8 kb Inserts überprüft. Zwei positive Klone - je eine SK<sup>+</sup> und eine SK<sup>-</sup> Variante (2,8 SK<sup>+</sup> bzw. 2,8 SK<sup>-</sup>) - wurden ausgewählt, um davon eine Plasmid-"Maxi"-Präparation herzustellen.

15

d) Plasmid-"Maxi"-Präparation von 2,8 SK<sup>+</sup> und 2,8 SK<sup>-</sup>

Die Plasmidpräparation nach Methode der alkalischen Lyse wurde aus 300 ml XLI-Blue-Transformanten beimpftem LB-Medium hergestellt. Eine Trennung der Plasmid-DNA von der RNA wurde durch differentielle Polyethylenglycol (PEG) Fällung mit anschließender Phenolätherextraktion und Isopropanolfällung vorgenommen.

#### IX. Sequenzierung des 2,8 kb Fragmentes mit Sequenase

Für die Sequenzierung wurden 2 käuflich erworbene lambda gt11-Primer als Ausgangspunkt der enzymatischen Synthese von Komplementärstrangabschnitten verwendet.

1.) Ein 15 Basen langes Einzelstrangnukleotid mit der Sequenz

5'.... G A C T C C T G G A G C C C G .... 3',

vom Hersteller als lambda gt11-Primer bezeichnet, das

Basen von der EcoRI-Insertionsstelle entfernt auf dem der  
SacI Schnittstelle zugekehrten lambda gt11-Arm anlagert  
(Fig. 7)

2.) Ein 15 Basen langes Einzelstrangnukleotid mit der Sequenz

5'.... G G T A G C C A C C G G C G C .... 3',

als lambda gt11 Reverse-Primer bezeichnet, das 7 Basen von  
der Eco RI-Schnittstelle entfernt auf dem der KpnI Schnitt-  
stelle zugekehrten lambda gt11-Arm anlagert (Fig. 7).

10 Damit war die Möglichkeit gegeben, das Insert von beiden Seiten  
her jeweils komplementär zu sequenzieren, und dadurch die gesamte  
Nukleotidsequenz des Fragmentes zu erhalten. Die gereinigte Plas-  
mid-DNA von 2,8 SK<sup>+</sup> und 2,8 SK<sup>-</sup> wurde nach Pelletierung, Waschen  
in 75%igem Ethanol und Repelletierung in 10 ul Wasser gelöst, und  
15 ein Aliquot von 1 ul davon zur Mengenbestimmung auf einem Gel  
aufgetragen. Demnach war die Konzentration der DNA 1-2 ug/ul.

#### Sequenzierprotokoll:

##### 20 1.) Annealing Reaktion

Annealing-Ansatz: Gesamtvolumen 10 ul

2 ul Plasmid-DNA (1-2 ug/ul)

2 ul H<sub>2</sub>O

2 ul Sequenzierpuffer (200 mM Tris, pH 7,5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>,

25 250 mM NaCl)

1 ul Primer (0,67 pMol/ul)

Die Annealing Mischung wurde in eine Glaskapillare aufgenommen, die  
beidseitig zugeschmolzen wurde. Diese wurde 5 Minuten im kochenden  
Wasser behandelt, dann rasch in -70°C kalten Alkohol getaucht,  
30 dort 5 Minuten belassen, danach auf 65°C gebracht und dann lang-

sam auf 35°C abgekühlt. Diese Prozedur bewirkt eine Trennung der Doppelsträng und Anlagerung der Primer.

Es wurden 4 Annealing Ansätze hergestellt, je 2 mit Primer und 5 Reverse-Primer.

## 2) Labelling Reaktion

Für die Labelling Reaktion wurde die "Labelling Stock-Lösung" sowohl für die Primer- als auch für die Reverse -Primer-Sequenzierung 1:2 bzw. 1:10 verdünnt. Die 1:2- und 1:10-Ansätze beziehen sich auf die relative Menge der desoxy (d)Nukleotide im Gemisch. Die 1:10-Verdünnung wurde für kurze Strangstücke zur besseren Auflösung der Anfangssequenzen verwendet, die 1:2-Verdünnung für längere Strangstücke.

15 Labelling Stock-Lösung: 7,5 uM dGTP

7,5 uM dCTP

7,5 uM dTTP

Labelling Ansatz:

Die 4 Annealing Ansätze wurde aus den Kapillaren in Reaktionsgefäße eingebracht.

Zu je 10 uL Annealingmischung wurden

1 uL 0,1 M Dithiothreitol (DTT)

2 uL dNukleotidverdünnung (je 1:2 und 1:10 für Primer und Reverse-Primer)

25

0,5 uL <sup>32</sup>P-alpha-dATP (1 mCi/ml)

2 uL Sequenase (1:8 in TE verdünnt)

zugegeben, gut gemischt, und die 4 Ansätze bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert.

### 3) Terminationsreaktion

Pro Ansatz wurden 4 Reaktionsröhrchen (A, G, C, T) mit je 2,5 µl "termination mix" (8 µM jedes didesoxy (dd) Nukleotids) auf 37°C gebracht. In diese wurden je 3,5 µl aus der entsprechenden Label-  
5 ling-Reaktionsansätze pipettiert, was zu einem Einbau der ddNukleotide führt und damit die Strangverlängerung beendet. Die Reaktion wurde nach einer 5 minütigen Inkubation bei 37°C durch Zugabe von je 4 µl einer Stopplösung (98,5% Formamid, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol, 0,5x TE, pH 8) beendet. Die Proben  
10 wurden bis zum Auftragen auf das Gel, dem eine 2 minütige Erhitzung der Proben auf 75 bis 85°C zur Strangdenaturierung vorausgeht, bei -20°C aufbewahrt.

### 4) Das Sequenziergel

- 15 97,5 ml 6%ige Acrylamid (AA) Stammlösung  
2,5 ml 20x TBE Puffer (1 M Tris, pH 7,5, 1 M Borat, 20 mM EDTA)  
220 µl Amoniumpersulfat (APDS), 25%ig in H<sub>2</sub>O  
50 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)

(6%ige AA-Stamm-Lösung:

- 20 57 g Acrylamid,  
3 g Bisacrylamid,  
481 g Harnstoff)

Vor dem Gießen des Gels waren die Glasplatten 3x H<sub>2</sub>O, 3x Alkohol gereinigt worden und eine der Platten 2x mit je 5 ml Silanisier-  
25 lösung (2%iges Dichlormehtylsilan in Chloroform) abgerieben worden. Das Gel polymerisierte über Nacht bei Raumtemperatur.

Das Gel wurde 1 Stunde vor Probenauftragung bei 2000 Volt unter Spannung gesetzt, um eine für die DNA-Naturierung notwendige  
30 Temperatur von mindestens 50°C zu schaffen. Die Proben wurden 2

Minuten auf 80°C erhitzt, die Geltaschen gut ausgespült, um Harnstoffpolymerisate zu entfernen. Die Ansätze mit der 1:2 verdünnten dNukleotid "Labelling-Mixture" wurden auf je 2 4-bahnigen Durchläufen (AGCT) aufgetrennt. Zwischen diesen Durchläufen lag  
5 die Zeitspanne zwischen Auftragen und Auslaufen des Blaumarkers und einer weitere Stunde. Nach weiterem 2maligen Auslaufen des Blaumarkers wurde die 1:10 Verdünnung wie oben auf 4 Bahnen aufgetragen und laufen gelassen, bis der Blaumarker den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Pro Tasche wurden 2 µl aufgetragen, die  
10 Spannung betrug 1500-2000 Volt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman DEAE-Papier aufgebracht, bei 80°C im Vakuum getrocknet und ohne Verstärkerfolie exponiert.

#### 5) Analyse der Sequenzdaten

15 Die sich aus dieser ersten Sequenzasereaktion ergebende Sequenz des Inserts was bereits bezüglich der Länge fast vollständig, da die Überlappung im mittleren Abschnitt des Inserts von beiden Seiten her gelesen werden konnte (Fig. 8). Nach einer Restriktionsanalyse der bereits vorhandenen Sequenzierdaten wurden  
20 einige wichtige singuläre 6-Basenschnittstellen ausgewählt, um eine Subklonierung der entsprechenden Fragmente mit anschließender Subsequenzierung vorzunehmen. Dies war notwendig, weil die vorhandene Sequenz noch Unklarheiten aufwies, Widersprüchlichkeiten zwischen komplementären Strangabschnitten zeigte, bzw.  
25 Lücken im Anfangsbereich beider Insertenden. Die ausgewählten Schnittstellen waren:

1.) Bcl I: T G A T C A

2.) Bgl II: A G A T C A

30 3.) BamH I: G G A T C C

Diese drei Stellen weisen untereinander die praktische Beziehung auf, daß sie dieselbe mittlere Basenfolge ..GATC.. aufweisen und nach Restriktion einen 4 Basenüberhang bilden. Daher sind mit diesen Enzymen geschnittene Fragmente untereinander ligierbar.

5

#### 6) Verifizierung der vorhandenen Daten

In Kontrollverdauen wurde die Richtigkeit der Sequenz der Bgl II und BamH I Schnittstelle durch Gelelektrophorese (1% Agarose) bestätigt. Sowohl 2,8 SK<sup>+</sup>- als auch 2,8 SK<sup>-</sup>-Fragmente wurden mit  
10 den Enzymkombinationen KpnI/Bgl II, Eco RI/Bgl II bzw. BamH I/Eco RI verdaut. Die erhaltenen Fragmente von ca. 1400 bp, 380 bp bzw. 350 bp waren mit den aus der Genkarte von SK bzw. vom 2,8 kb Fragment errechneten Bandenlängen kompatibel. Abweichungen von  $\pm 30$  Basenpaaren waren aus Gründen der Sequenzunvollständigkeit  
15 noch möglich.

Zur Bestätigung der erhaltenen Sequenzierdaten bzw. Korrektur der Unklarheiten wurden nun folgende Versuchsanordnungen durchgeführt:

20

#### X. Sequenzierung von Subfragmenten des 2,8 kb Fragmentes nach Maxam & Gilbert

##### 1) <sup>32</sup>P von Subfragmenten nach Bgl II Verdau

25 Prinzip: Durch Bgl II Verdau entstehen zwei 5'-überhängende Enden. 5'..A..GATCT..3'. Diese werden von der reversen Transkriptase (RT) als Ausgangspunkt für eine <sup>32</sup>P-alpha-dATP Markierung von 5'nach 3' verwendet. Anschließendes Nachverdauen mit SacI ergibt 2 radioaktiv markierte Fragmente.

- 1.) Ein kurzes Bgl II / SacI-Fragment von ca. 1400 bp
- 2.) Ein langes von Bgl II ausgehend, das Restplasmid umfassende Fragment von ca. 4300 bp.

5 Bgl II Verdau von 2,8 SK<sup>+</sup>: Ges. vol 200 ul: 10 ug DNA wurden mit high salt Puffer (10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl und 100 ug/ml Rinderserumalbumin) und 60 U Bgl II bei 37°C über Nacht verdaut. Der Verdau wurde phenolisiert (1/4 vol Phenol/Tris saturiert) 2x mit Ether extrahiert und mit Isopropal-10 nol gefällt. Nach Pelletierung, Waschen der Pellets in 70%igem Ethanol und Repelletierung wurde die DNA in 20 ul H<sub>2</sub>O gelöst.

<sup>32</sup>P-Markierung der beiden Bgl II Enden: Ges. vol 50 ul

20 ul DNA (1 ug/ul)

5 ul 10x RT Puffer

15 3 ul <sup>32</sup>P-alpha-dATP (1mCi/ml)

5 ul dGTP (10 mM)

1 ul BSA (50 mg/ml)

2 ul RT (20 U/ul)

14 ul H<sub>2</sub>O

20 Das Gemisch wurde 1 Stunde bei 25°C inkubiert.

Anschließend wurde mit SacI nachverdaut. Dazu wurde der RT-Ansatz auf eine Konzentration von 10 mM Tris und 10 mM MgCl<sub>2</sub> eingestellt und damit SacI-kompatibel gemacht. Der Verdau wurde eine Stunde  
25 bei 37°C inkubiert.

Die Elution der beiden Fragmente wurde nach unter VIII 1 beschriebener Vorschrift aus einem Agarosegel durchgeführt. Nach Phenolisierung und 2-maliger Etherextraktion der wässrigen Phase  
30 erfolgte die Aufteilung der beiden Eluate auf je 5 Reaktionsge-

fäße mit anschließender Ethanolfällung der markierten Fragmente bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 2) Sequenzierung nach Maxam & Gilbert

5

### a) Sequenzierprotokoll

Die DNA-Fragmente (kleines Fragment: ca. 1400 bp, großes Fragment: ca. 4300 bp) wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen und pelletiert (je 5 Pellets/Fragment) und nach Maxam & Gilbert sequenziert. Nach Beendigung des Sequenziervorganges wurden die aus den 5 Ansätzen (G, G+A, C+T, C, A+C) erhaltenen Pellets einzeln nach Cerenkov gemessen und danach in unterschiedlichen Volumina - mindestens jedoch 12  $\mu\text{l}$  - Formamid-stop-Puffer gelöst, sodaß jedes Gemisch gleich viel Radioaktivität/ $\mu\text{l}$  aufwies. Die fertigen Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### b) Sequenzgele

Durch Auftragen auf Polyacrylamid (PAA)/Harnstoff-Gele mit unterschiedlicher AA-Konzentration (6 %ig bzw. 20 %ig) wurde eine bessere Auflösung in den Anfangssequenzen erreicht.

20 %iges Gel für 60 ml:

20 % AA stock: 197 g AA

1,5 ml 20x TBE Puffer,

3 g BisAA

58,5 ml 20 %ige AA stocksolution

481 g Harnstoff

25 90  $\mu\text{l}$  25%iges APDS (Ammoniumperoxodisulfat)40  $\mu\text{l}$  TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

2  $\mu\text{l}$  pro Bahn jedes Ansatzes wurden 2 Minuten auf  $80^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend auf die Gele aufgetragen. Am 6%igen Gel wurden die Proben - kleines und großes Fragment nebeneinander geführt -

in 3 fünfbahnigen (G, G+A, C+T, C, C+A) Durchläufen bei 2000 Volt aufgetrennt. Zwischen den Durchläufen lagen beide Male die Zeitspanne bis zum Auslauf des Blaumarkers plus eine Stunde. Am 20 %igen Gel wurde nur jeweils ein fünfbahniger Durchlauf aufgetrennt, bis der Blaumarker in der Gelmitte angelangt war.

c) Auswertung der aus der Maxam & Gilbert Sequenzierung erhaltenen Daten

Durch diesen zweiten Sequenzierdurchgang konnten die Lücken an den Insertenden ergänzt und ein großer Teil der Unklarheiten beseitigt werden.

#### XI. Weitere Subklonierungen als zusätzliche Kontrolle

##### 15 1) Isolierung eines BamHI/HincII-Fragmentes mit Subklonierung und Einzelstransequenzierung durch Sequenase.

Das Ziel war es, die Veränderung der nicht schneidbaren Eco RI-Schnittstelle genau zu beschreiben. Deshalb wurde eine singuläre 20 HincII-Schnittstelle ausgewählt, die 126 Basen außerhalb dieser Eco RI-Schnittstelle entfernt auf dem der SacI-Schnittstelle zugewandten lambda-gt11-Arm liegt.

##### a) BamHI/HincII Verdau

- 25 i) von 2,8 SK<sup>+</sup>: 3 ug DNA wurden mit je 15 U BamHI und HincII in high salt Puffer (HS) verdaut,
- ii) von SK<sup>+</sup> und SK<sup>-</sup>: je 2 ug SK<sup>+</sup> bzw. SK<sup>-</sup> wurden von je 10 U BamHI und HincII in HS Puffer verdaut. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

Nach Gelelektrophorese wurde das BamHI/HincII Fragment eluiert (s. unter VIII 1 b). Eine Hälfte des Eluates wurde mit dem SK<sup>+</sup>-Verdau, die andere Hälfte mit dem SK<sup>-</sup>-Verdau vereinigt, und beide DNA-Gemische mit Ethanol gefällt.

5

b) Nach Pelletierung der beiden DNA Fällungen erfolgten Ligation und Transformation in XLI blue (wie unter VIII 2 b und c beschrieben).

10 2.) Isolierung eines Eco RI/Bgl II-Fragmentes mit Subklonierung und Einzelstrangsequenzierung durch Sequenase

a.) Eco RI/Bgl II-Verdau

- 15 i) von 2,8 SK<sup>+</sup>: 12 ug 2,8 SK<sup>+</sup> DNA wurden mit je 60 U Eco und Bgl II in HS Puffer verdaut
- ii) Von SK<sup>+</sup> und SK<sup>-</sup>: je 2 ug SK<sup>+</sup> bzw. SK<sup>-</sup> wurden von 10 U BamHI und 10 U Bgl II in HS Puffer verdaut. Die Inkubationen wurden über 3 Stunden bei 37°C durchgeführt.

Die zu i) korrespondierenden Verdaue von SK<sup>+</sup> und SK<sup>-</sup> wurden mit 20 Eco RI und BamHI durchgeführt (das Bluescriptplasmid besitzt keine Bgl II Schnittstelle am Polylinker). Dabei wurde die Ligierbarkeit der beiden palindromischen Schnittstellen verwertet.

Nach Gelelektrophorese wurde das Eco RI/Bgl II Fragment eluiert 25 (wie unter VIII 1 b) und mit den Eco RI/BamHI verdauten SK<sup>+</sup>- und SK<sup>-</sup>-Plasmiden (wie unter XI 1 a beschrieben) mit Ethanol gefällt.

b.) Ligation und Transformation erfolgten wie unter VIII 2 b und c beschrieben.

Verifizierung der in XI 1 und XI 2 durchgeführten Transfor-  
mationen.

Durch Plasmidpreparation nach Methode der alkalischen Lyse wurde  
aus den Transformanten beider Ligationen die Subfragment-tragen-  
5 den SK<sup>+</sup>- und SK<sup>-</sup>-Bluescript-Plasmide isoliert.

Kontrollverdaue der Rekombinanten:

- 1.) BamHI/HincII zur Bestätigung der BamHI/HincII-Insertion
- 2.) Eco RI/XbaI zur Bestätigung der Eco RI/Bgl II-Insertion  
(die Bgl II-Stelle war durch Ligierung mit der BamHI-  
10 Schnittstelle nicht mehr schneidbar)

Beide Verdaue wurden auf Agarose-Gelelen aufgetrennt. Dadurch  
konnten Ligation und Transformation beider Subfragmente in SK<sup>+</sup>  
bzw. SK<sup>-</sup> dokumentiert werden. Gleichzeitig konnten die Ausgangs-  
klone für die Einzelstrangsequenzierung nach qualitativen und  
15 quantitativen Kriterien ausgewählt werden.

3) Einzelstrangsequenzierung von Bluescript-DNA-Subfragmenten

a) Herstellung von Einzelstrang-DNA durch Helfer-Phagen

20 Je ein SK<sup>+</sup> und SK<sup>-</sup> Subklon mit dem BamHI/HincII- bzw. dem Eco  
RI/BglII-Fragment wurde in 2,5 ml Vorkultur (LB/amp/tet) über  
Nacht bei 37°C vermehrt. Daraus wurden mit je 50 µl wieder 2,5 ml  
LB beimpft. Nach 30 Minuten bei 37°C wurden je 10 µl des Blue-  
script- Helferphagen R408 mit einem Titer von 5,5 x 10<sup>10</sup> plaque  
25 forming units/ml zugegeben und die 4 Kulturen 8 Stunden bei 37°C  
geschüttelt. Anschließend wurden je 1,2 ml in Reaktionsröhrchen  
transferiert und 15 Minuten bei 15 000 g zentrifugiert. Die Ein-  
zelstrangvarianten der Insert-tragenden Plasmide

Eco RI/BamHI SK<sup>+</sup> ligiert mit Eco RI/Bgl II-Fragment

30 Eco RI/BamHI SK<sup>-</sup> ligiert mit Eco RI/Bgl II-Fragment

HincII/BamHI SK<sup>+</sup> ligiert mit HincII/BamHI-Fragment

HincII/BamHI SK<sup>-</sup> liegt mit HincII/BamHI-Fragment

waren nun im Überstand und wurden mit 300 µl Polyethylenglycol (20%igem PEG 6000 in 3,5 M Ammonacetat) gefällt. Nach 15 Minuten

5 bei Raumtemperatur erfolgte Pelletierung und Lösen der Einzelstrang DNA in 300 µl TE Puffer. Nach Phenol- und 2maliger Etherextraktion der wässrigen Phase erfolgte die Ethanolfällung unter Zusatz von 50 vol% 7,5 M Ammonacetat bei -70°C.

10 Als Primer für das Einzelstrangsequenzieren mit Sequenase wurden 2 käufliche Oligonukleotide verwendet, die Abschnitten des Bluescript-LacZ Gens zu beiden Seiten des Polylinkers entsprechen.

1.) T3-Primer: ein 17 Basen langes Oligonukleotid mit der Sequenz

15 5'.....A T T A A C C C T C A C T A A A G .... 3'

auf der SacI-Seite des SK LacZ-Genes dem Polylinker vorgeschaltet, für die Primingreaktion mit den SK<sup>-</sup>-Rekombinanten (Fig. 9).

20 2.) T7-Primer: ein 17 Basen langes Oligonukleotid mit der Sequenz

5'.... A A T A C G A C T C A C T A T A G .....3'

auf der KpnI-Seite dem Polylinker vorgelagert, für die Primingreaktion mit den SK<sup>+</sup>-Rekombinanten (Fig. 9).

25 c) Sequenzierprotokoll

Die Einzelstrang DNA wurden nach der PEG-Behandlung mit 70%igem Ethanol gewaschen, pelletiert und in 10 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Gelkontrolle von Aliquoten (1 µl) wurden je 7,5 µl DNA mit etwa 400-600 ng/Ansatz in die Annealingreaktion eingesetzt. Die dNukleotidverdünnung für die Labellingreaktion wurde mit 1,5 (dNukleo-

30

tid-Stammlösung in  $H_2O$ ) angesetzt, die Markierung erfolgte mit  $^{32}P$ -alpha-dATP. Alle weiteren Schritte waren identisch mit den bereits in der ersten Sequenasesequenzierung beschriebenen. Die Terminationsgemische wurden in je 2 vierbahnigen (ACGT) Durchläufen, zwischen denen jeweils die Zeitspanne für das zweimalige Auslaufen des Blaumarkers lag, aufgetrennt. Es wurde ein 6 %iges Gel verwendet.

d) Auswertung der nach diesem dritten Sequenzierdurchgang erhaltenen Daten.

Die durch die Einzelstrang-Sequenzierung durch Sequenase nunmehr vollständige dreifach kontrollierte Nukleotidsequenz des Hauptallergens der Birke *Bet v I* ist Fig. 10 zu entnehmen.

15

Die Länge des cDNA Inserts beträgt 727 Basen (Fig. 10).

Die Basen 1-11, d.h. die Basen bis zur Schnittstelle der (T-deletierten) Eco RI-Stelle an den Positionen 11-15, und die Basen 739-744, d.h. die Basen von der Schnittstelle der (intakten) Eco RI-Stelle bis zum Sequenzende, stammen vom Phagen lambda gt11.

20

#### 1) Der kodierende Abschnitt

Die für *Bet v I* kodierende Sequenz ist in Fig. 10 durch Beginn und Ende der zur Nukleotidsequenz parallel laufenden Aminosäuresequenz gekennzeichnet. Das kodierte Protein weist ein errechnetes MG von 17.570 auf. Die Sequenz beginnt mit dem für die Aminosäure (AS) Methionin kodierenden Basentriplett ATG (Position 65-67) und endet mit dem Basentriplett TAA (Position 545-547). Diese beiden Triplets sind durch den genetischen Code als An-

25

30

fangs- und Endcodons definiert. Von ATG bis TAA ist der Leserahmen offen.

Die aus dieser Nukleotidsequenz erhaltene Proteinsequenz stimmt  
5 überein mit der AS-Sequenz des Proteins *Bet v I*, das bis zur AS  
35 vom N-Terminus sequenziert wurde.

Die Basentriplets von Position 311 bis Position 319 kodieren für  
die AS: Asn-Tyr-Ser. Es handelt sich bei diesem AS-Triplett um  
10 eine potentielle Glykosylierungsstelle.

Die DNA-Sequenz von *Bet v I* zeigt hohe Homologie mit einem  
Krankheitsresistenz hervorrufenden Gen der Erbse, wie dies  
bereits in der Einleitung erörtert wurde.

15

## 2) Nicht-kodierende Abschnitte

a) Der nicht-kodierende Abschnitt von Base 12 bis Base 64

Die Veränderung der Eco RI-Stelle an Position 11 wurde durch eine  
20 Deletion eines Thymidin hervorgerufen.

Bei den unmittelbar dem Startcodon vorangehenden Basen: GCC ATC  
ATG handelt es sich um eine in der Literatur beschriebene Signal-  
sequenz, wobei das in minus-3-Position stehende A konstant ist,  
die anderen Basen aber differieren können (Lutcke et al., EMBO J.  
25 6, 43-48, 1987).

b) Der nicht-kodierende Abschnitt von Base 548 bis 744

Das Ende der cDNA ist durch eine poly-Adenylsequenz von 29 A  
charakterisiert.

30 Die Basensequenz von Position 693-698 AAT AAA ist als eine für

die Polyadenylierung wesentliche Konsensus-Signalsequenz in der Literatur beschrieben (M. Birnstiel et al., Cell 41, 349, 19..).

Aus obigen Daten geht hervor:

Es wurde die gesamte mRNA über cDNA kloniert. Der Leserahmen ist 5 offen. Es handelt sich bei oben angeführter Sequenz um das vollständige Gen des Proteins *Bet v I*.

Zusammenfassende Legenden zu den beiliegenden Figuren

Fig. 1. RNA-Charakterisierung auf 6% Polyacrylamid - 50% Harnstoffgel. M: Marker. 1-5: unabhängige RNA Isolationen aus männlichen Infloreszenzen.

5

Fig. 2. Detektion positiver Insert-tragender Klone mittels IgE-Antikörpern aus Allergikerseren.

- 1) 1. Detektionsschritt: 2 positive Klone (Pfeil) weitergezogen
- 2) Reklonierung der positiven Klone

10

Fig. 3. Restriktionskarte des Phagen lambda gt11. Pfeil (mit Stern) markiert die Insertionsstelle für die cDNA.

15

Fig. 4 A.

- 1) lambda gt11 DNA mit Insert (KpnI/SacI-verdaut): 2,8 kbp  
KpnI/SacI-Fragment (Karo).
- 2) lambda gt11 DNA ohne Insert (KpnI/SacI-verdaut): 2,08 kbp  
KpnI/SacI-Fragment (Karo).
- 3) lambda gt11 DNA mit Insert (SacI/Eco RI-verdaut): 1,06 kbp  
SacI/Eco RI-Fragment (Doppelkaro).
- 4) lambda gt11 DNA ohne Insert (SacI/Eco RI-verdaut): 1,8 kbp  
SacI/Eco RI-Fragment (Doppelkaro).
- 25 5) lambda Wildtyp-DNA PstI verdaut.

Fig. 4 B. Ausschnitt aus dem lambda gt11 Genom mit dem cDNA-Insert, den beiden Eco RI-Schnittstellen (die der SacI-Stelle nh r liegende ist deletiert) und den flankierenden KpnI- und SacI-Schnittstellen. Der Anteil des lac Z-Gens ist durch Punkte 5 unterlegt.

Fig. 5. Western-/Immunoblot

A) Immunoblot mit Allergikerserum; Detektion mit <sup>125</sup>J-anti IgE.

- 1) Proteinextrakt aus *E. coli* Y 1089
- 10 2) Proteinextrakt aus *E. coli* Y 1089 infiziert mit lambda gt11 ohne Insert
- 3) Proteinextrakt aus *E. coli* Y 1089 infiziert mit lambda gt11 Insert-tragend (Klon HB6)
- 4) Proteinextrakt aus *E. coli* Y 1089 infiziert mit lambda gt11
- 15 Insert-tragend (Klon HB8)
- 5) Birkenpollenextrakt BP VIII D

B) Immunoblot mit monoklonalem Antikörper Bip 1; Detektion mit anti-Maus IgG (Kaninchen) und <sup>125</sup>J-anti-Kaninchen Ig.

- 20 1) Proteinextrakt aus *E. coli* Y 1089
- 2) Proteinextrakt aus *E. coli* Y 1089 infiziert mit lambda gt11 ohne Insert
- 3) Proteinextrakt aus *E. coli* Y 1089 infiziert mit lambda gt11 Insert-tragend (Klon HB6)
- 25 4) Proteinextrakt aus *E. coli* Y 1089 infiziert mit lambda gt11 Insert-tragend (Klon HB8)
- 5) Birkenpollenextrakt BP VIII D

## 43

Fig. 6. Restriktionskarte des Plasmides pBluescript SK(+/-).

Fig. 7. Ausschnitt aus dem 2,8 kb-Fragment zur Darstellung des cDNA-Inserts mit lambda gt11-Sequenzier-Primern; die Pfeile 5 weisen in Syntheserichtung.

Fig. 8. Autoradiographie des Sequenziergels nach der ersten Sequenzierung des cDNA-Inserts mit Hilfe der lambda-gt11-Primer und Sequenase; radioaktives Isotop:  $^{32}\text{P}$ .

10

Fig. 9. Ausschnitt aus dem lacZ-Gen des Bluescriptplasmids. Dargestellt ist der Bereich vom T7-Promotor bis zum T3-Promotor. Dazwischen liegt der Polylinker. Anfangs und Ende der beiden Primer sind durch Pfeile angedeutet.

15

Fig. 10. Darstellung der endgültigen Sequenz des cDNA-Inserts.

## Patentansprüche:

1. Verfahren zum Screenen einer Expressions-cDNA-Klonbank zur Auffindung von Polynukleotiden, die in ihrem offenen Leserahmen für Proteine kodieren, deren biologische Aktivität als Allergene den in der Natur  
5 vorkommenden Pflanzenallergenen entsprechen, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Expressions-cDNA-Klonbank exprimierten Proteine mittels aus Allergikerseren stammender IgE-Antikörper identifiziert werden.
2. Abwandlung des Verfahrens nach Anspruch 1,  
10 dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierten Proteine mittels poly- oder monoklonaler Antikörper identifiziert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische allergene Aktivität  
15 des Proteins durch aus Allergikerseren stammende IgE-Antikörper nachgewiesen wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein als Allergen durch die biologische allergene Aktivität des Proteins  
20 durch monoklonale Antikörper, z.B. Bip 1, Bip 4, identifiziert wird.
5. Verfahren zur Herstellung eines im Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 einsetzbaren Reaktanten, dadurch gekennzeichnet, daß das für das identifizierte Protein  
25 kodierende Polynukleotid in lambda-gt11-Phagen inseriert wird.
6. Verfahren zur Herstellung eines im Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 einsetzbaren Reaktanten, dadurch gekennzeichnet, daß das für das identifizierte Protein  
30 kodierende Polynukleotid in das Plasmid "Bluescript SK (+/-)" inseriert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der erzeugte Vektor in einem einzelligen Mikroorganismus, insbesondere E.coli, zur Expression gebracht wird.

5 8. Polynukleotid, das nach dem Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 gescreent wurde, dadurch gekennzeichnet, daß es für die durch die Sequenz festgelegten allergen wirksamen Epitope des Proteins kodiert, wobei es den in Fig. 10 wiedergegebenen Aufbau aufweist.

10 9. Polynukleotid nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es die in Fig. 10 wiedergegebene Sequenz oder Teilsequenzen daraus aufweist.

10. Polynukleotid nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß es eine der mit der Sequenz gemäß  
15 Fig. 10 unter stringenten Bedingungen hybridisierende Sequenz aufweist und für das nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1 identifizierte Protein kodiert.

11. Polynukleotid nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß es eine durch Degeneration der  
20 Sequenz gemäß Fig. 10 abgeleitete Sequenz aufweist und für das nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1 identifizierte Protein kodiert.

12. Verfahren zur Behandlung von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß

25 a) eine DNA-Sequenz, wie sie in Fig. 10 wiedergegeben ist, oder

b) eine mit dieser Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisierende und für ein in Fig. 10 wiedergegebenes Protein codierende Sequenz, oder

30 c) eine durch Degeneration der Sequenz gemäß Fig. 10 abgeleitete Sequenz

in das Genom der Pflanze zur Expression eines unter Stressbedingungen bzw. bei Kontakt mit Pflanzenpathogenen Resistenz bewirkenden Proteins eingeführt wird.

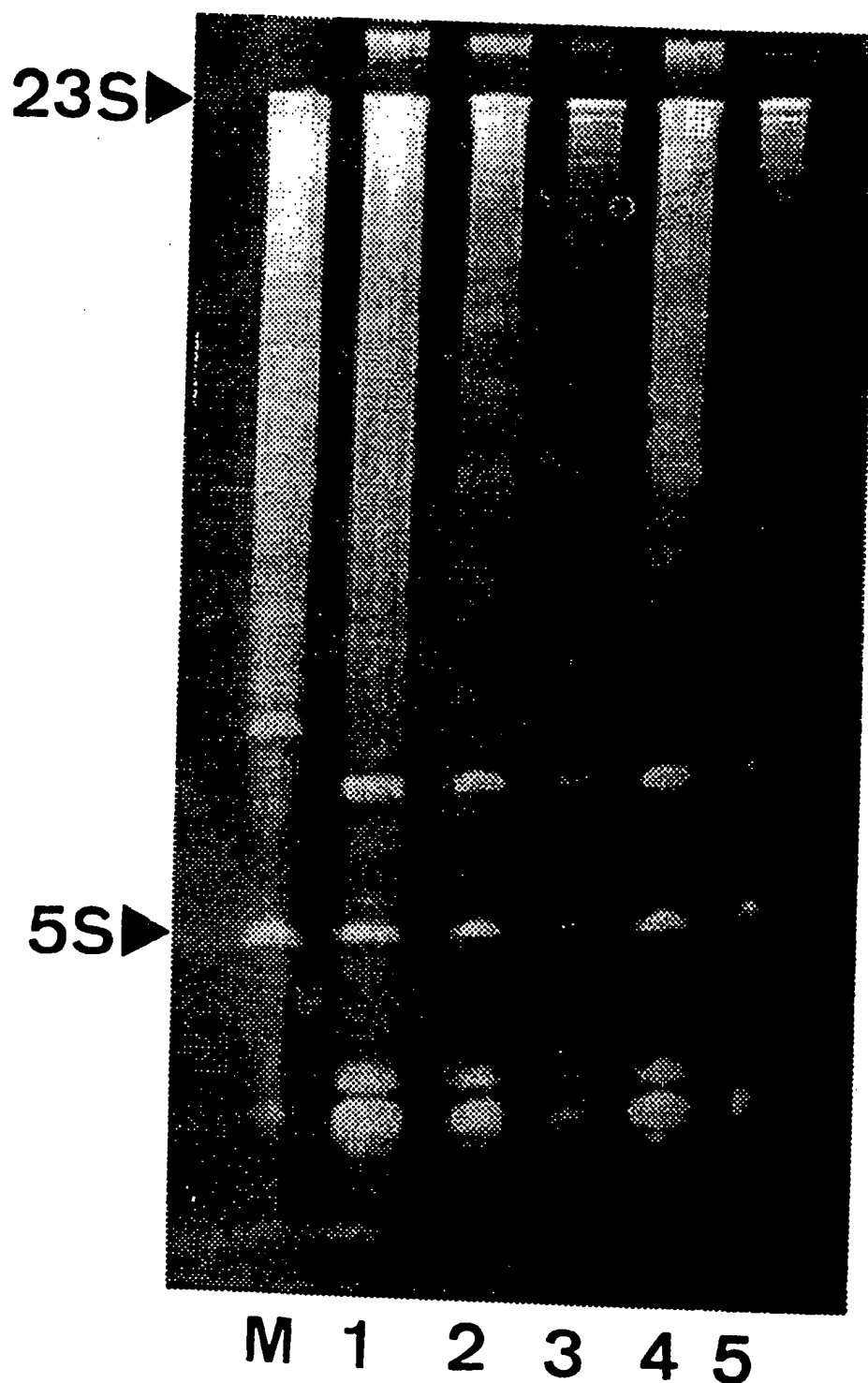
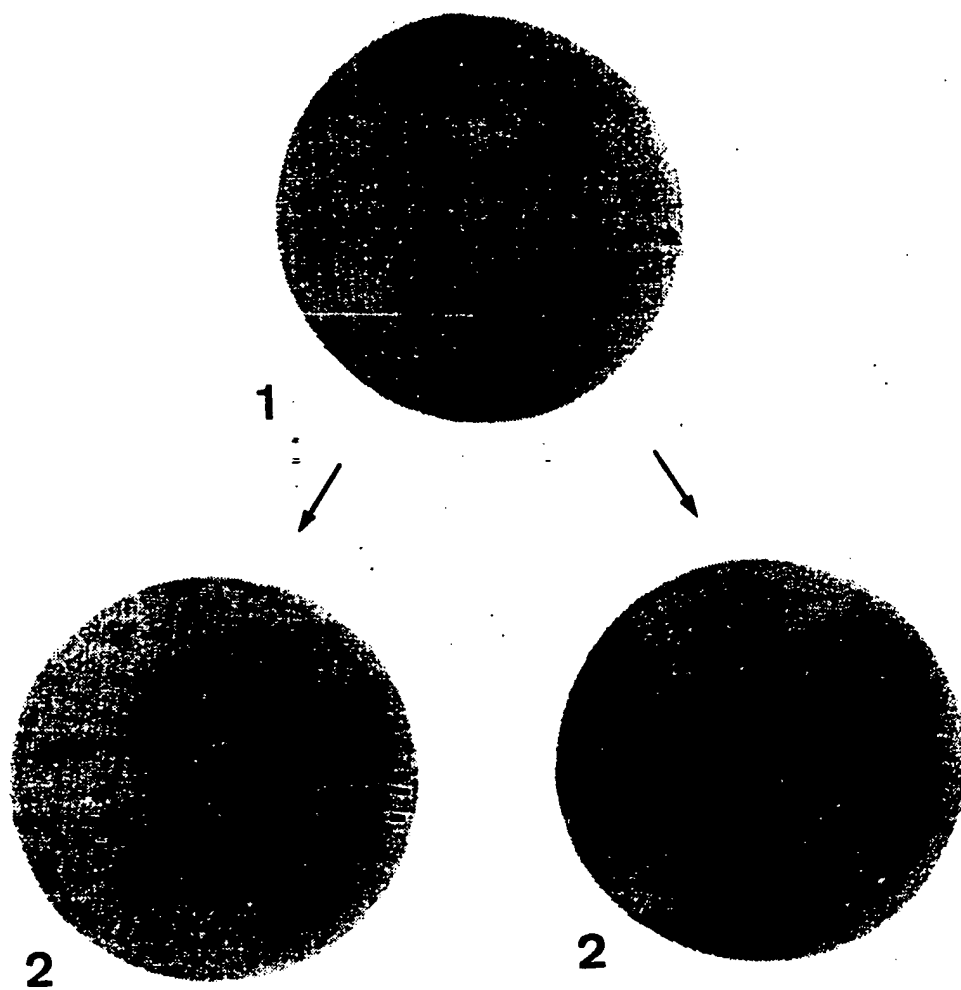
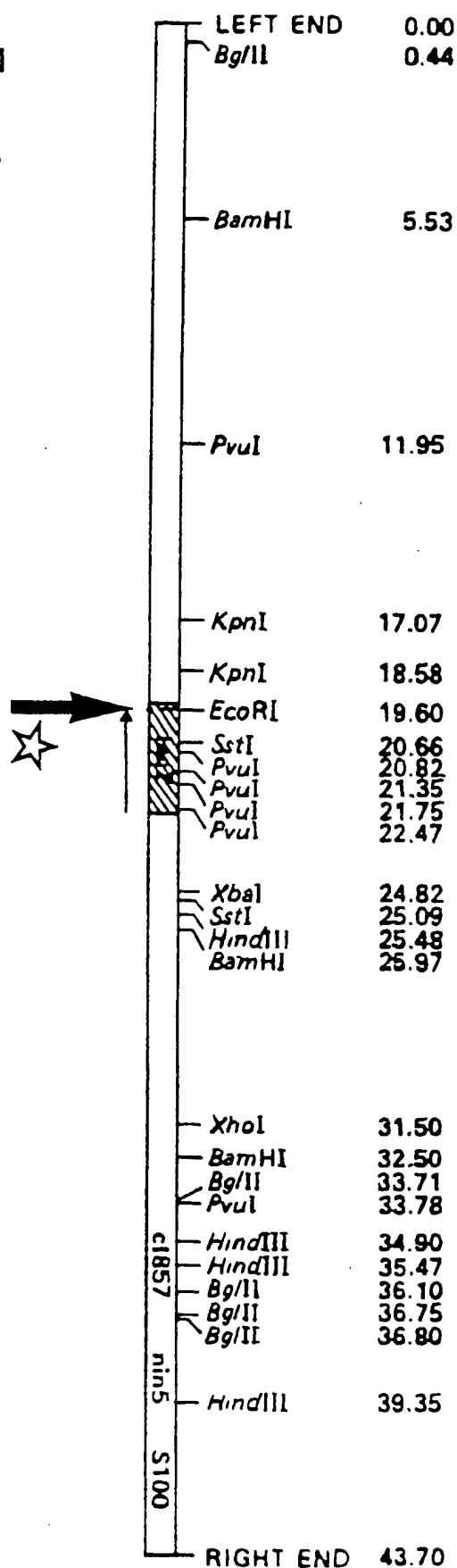


Fig.1



**Fig.2**

Fig. 3



ERSATZBLATT

4/10

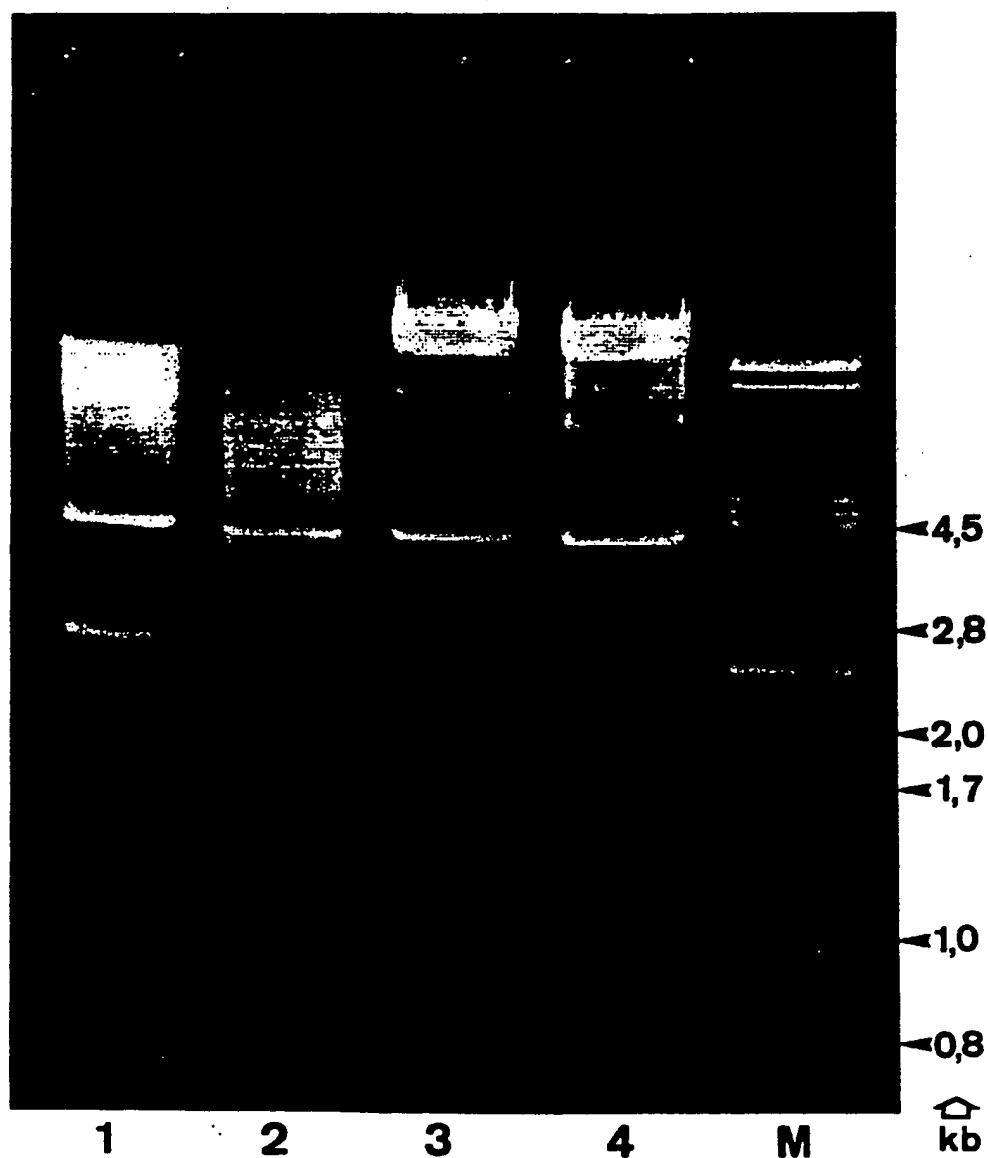


Fig.4A

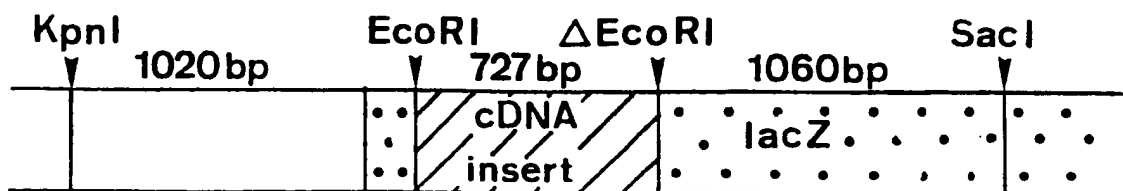


Fig.4 B

ERSATZBLATT

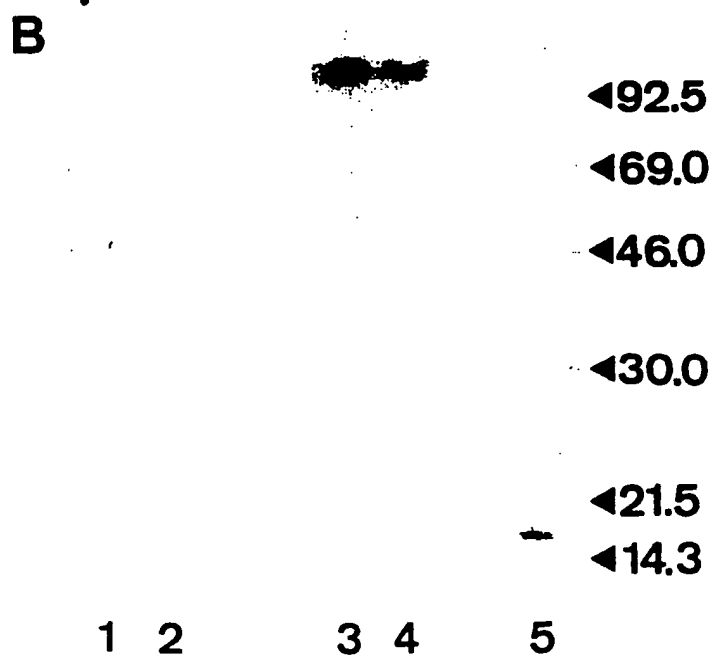
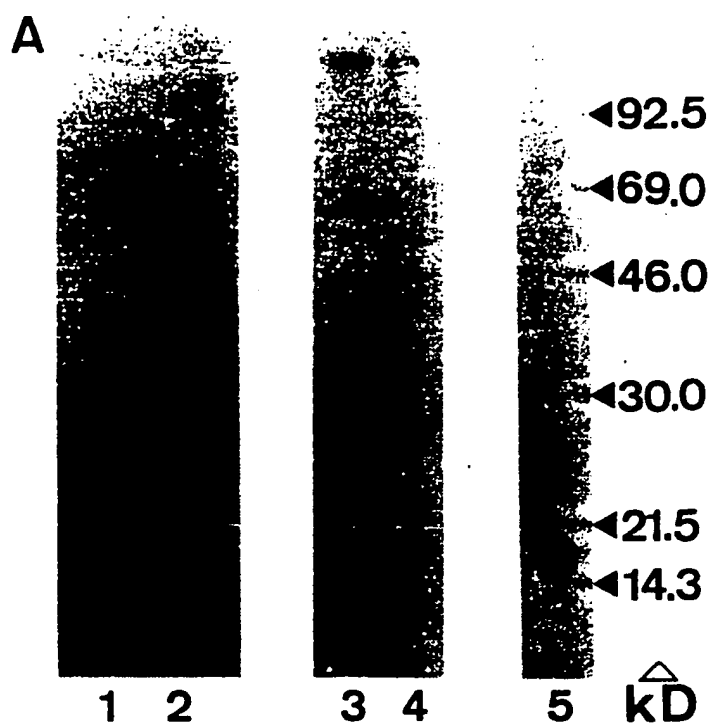
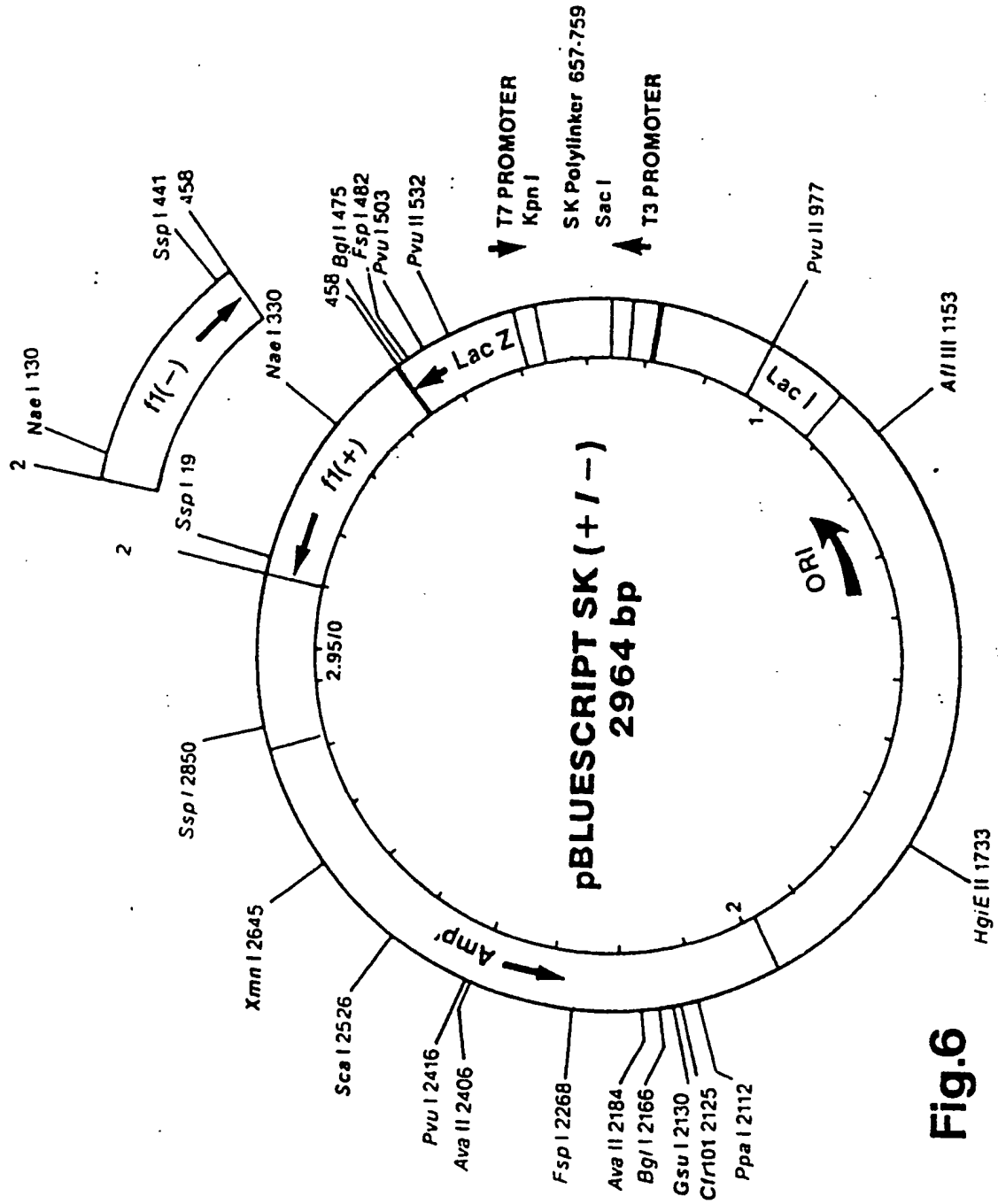


Fig.5



**Fig.6**

7/10

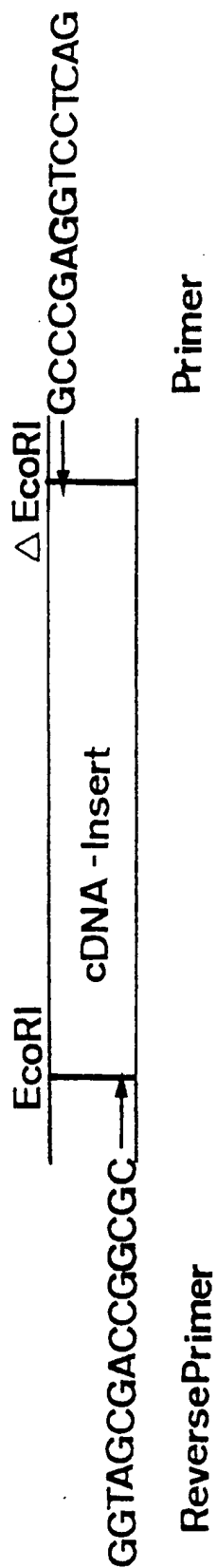


Fig. 7

ERSATZBLATT



Fig. 8

9/10

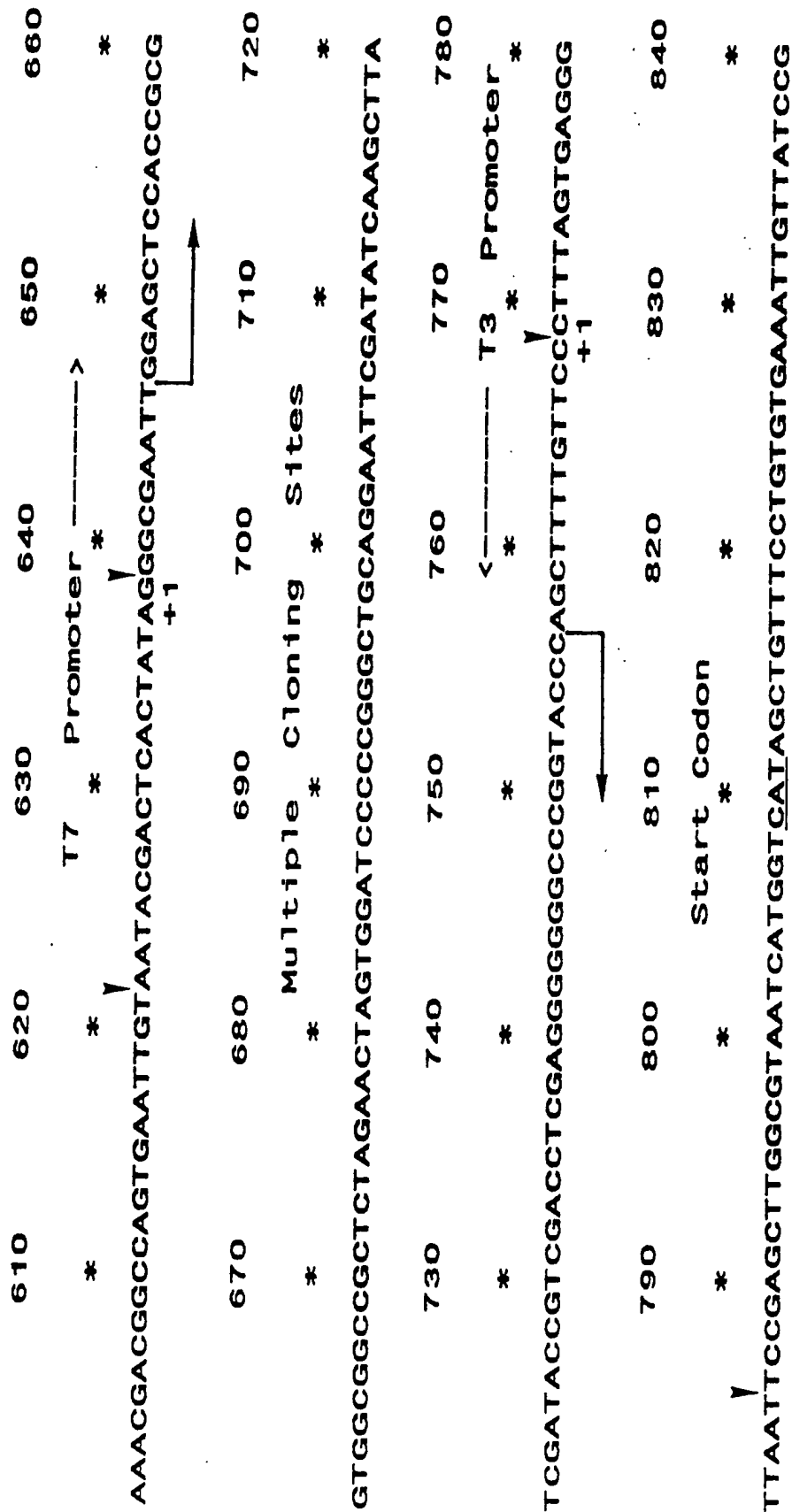


Fig. 9

1  
 agtatcggcggaatcctggttctaattccatttatcacatccaattaaaaatctctcaggccatc 64  
 65  
 ATG GGT GTT TTC AAT TAC GAA ACT GAG ACC ACC TCT GTT ATC CCA GCA 112  
 Met Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala 16  
 113  
 GCT CGA CTG TTC AAG GCC TTT ATC CTT GAT GGC GAT AAT CTC TTT CCA 160  
 Ala Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro 32  
 161  
 AAG GTT GCA CCC CAA GCC ATT AGC AGT GTT GAA AAC ATT GAA GGA 208  
 Lys Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn 48  
 209  
 GGA GGG CCT GGA ACC ATT AAG AAG ATC AGC TTT CCC GAA GGC TTC 256  
 Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro 64  
 257  
 TTC AAG TAC GTG AAG GAC AGA GTT GAT GAG GTG GAC CAC ACA AAC 304  
 Phe Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe 80  
 305  
 AAA TAC AAT TAC AGC GTG ATC GAG GGC GGT CCC ATA GGC GAC ACA 352  
 Lys Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu 96  
 353  
 GAG AAG ATC TCC AAC GAG ATA AAG ATA GTG GCA ACC CCT GAT GGA 400  
 Glu Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly GGA 112  
 401  
 TCC ATC TTG AAG ATC AGC AAC AAG TAC CAC ACC AAA GGT GAC CAT 448  
 Ser Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His GAG 128  
 449  
 GTG AAG GCA GAG CAG GTT AAG GCA AGT AAA GAA ATG GGC GAG ACA 496  
 Val Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr CTT 144  
 497  
 TTG AGG GCC GTT GAG AGC TAC CTC TTG GCA CAC TCC GAT GCC TAC 544  
 Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr AAC 160  
 545  
 TAA TTAATTAACCTGTGTCGTCGTAACATGTCCCTGATCAATAATGGGTTGCAGTGTTTCATG 607  
 End  
 608  
 GTGTTTTTTGGGTCTAATAAAGGAGCTTGCAAGTTGTGATCATCTGCTTGCTAGCTGAAGATGTT 671  
 672  
 GTAATTTATTGGGAGAATGATAATAAATGTTCTATTAAAAA  
 735  
 736 744  
 Aggaattcc

Fig.10

ERSATZBLATT

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/AT 89/00058

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC C 12 N 15/00, G 01 N 33/68, G 01 N 33/577, A 01 N 65/00, Int.Cl. <sup>5</sup> : A 01 H 1/00		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System :	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>5</sup> :	C 12 N, G 01 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*</b>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 81, No: 1, January 1988 (St Louis, US), T.W. Hatton et al.: "Molecular cloning of Kentucky bluegrass (KBG) pollen allergens", abstract No: 58, page 183, see the whole article --	1-5,7
A	Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., vol. 87, No: 1, 1988, Karger AG (Basel, DE), H. Breiteneder et al.: "Isolation and characterization of messenger RNA from male inflorescences and pollen of the white birch (Betula Verrucosa)", pages 19-24, see the whole article --	1-11
A	Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 72, No: 2, August 1983 (St Louis, US), H. Ipsen et al.: "Isolation and immuno-chemical characterization of the major allergen of birch pollen (Betula verrucosa)" pages 150-159, see the whole article --	1-11
T	The EMBO Journal, vol. 8, No: 7, July 1989, IRL Press, H. Breiteneder et al.: "The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene", pages 1935-1938 see the whole article	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
8 September 1989 (08.09.89)	11 October 1989 (11.10.89)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT 89/00058

<b>I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <small>*Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC</small> Int. Cl. 5: C 12 N 15/00, G 01 N 33/68, G 01 N 33/577, A 01 N 65/00, A 01 H 1/00		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem Int. Cl. 5	Klassifikationssymbole C 12 N, G 01 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b>		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. 13
X	Journal of Allergy and Clinical Immunology, Band 81, Nr. 1, Januar 1988 (St Louis, US), T.W. Hatton et al.: "Molecular cloning of Kentucky bluegrass (KBG) pollen allergens", Zusammenfassung Nr. 58, Seite 183, siehe den ganzen Artikel --	1-5,7
A	Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., Band 87, Nr. 1, 1988, Karger AG (Basel, DE), H. Breiteneder et al.: "Isolation and characterization of messenger RNA from male inflorescences and pollen of the white birch (Betula Verrucosa)", Seiten 19-24, siehe den ganzen Artikel --	1-11
A	Journal of Allergy and Clinical Immunology, Band 72, Nr. 2, August 1983 (St Louis, US), H. Ipsen et al.: "Isolation and immunochemical characterization of the major ./.	1-11
<small>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</small> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 8. September 1989		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">11 OCT 1989</div>
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">T.K. WILLIS</div>

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	<p>allergen of birch pollen (Betula verrucosa)", Seiten 150-159, siehe den ganzen Artikel</p> <p>--</p>	
T	<p>The EMBO Journal, Band 8, Nr. 7, Juli 1989, IRL Press, H. Breiteneder et al.: "The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene", Seiten 1935-1938, siehe den ganzen Artikel</p> <p>----</p>	